

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA



**Ligandos selectivos de G-quadruplexos de ADN
para a terapia do cancro**

Derivados de indolo[3,2-b]quinolinas

Ana Cláudia Bernardes Martins

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA**

2012-2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



Ligandos selectivos de G-quadruplexos de ADN para a terapia do cancro

Derivados de indolo[3,2-b]quinolinas

Orientadora: Doutora Maria Alexandra da Silva Paulo, Faculdade de Farmácia,
Universidade de Lisboa

Co-orientador: Doutor João Paulo Martins Ferreira Lavrado, Faculdade de Farmácia,
Universidade de Lisboa

Ana Cláudia Bernardes Martins

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para a
obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa, 2012-2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Alexandra Paulo, e ao meu co-orientador, Doutor João Lavrado, por toda a ajuda que me deram, tanto a nível laboratorial como na escrita deste trabalho, e pela paciência que tiveram para comigo ao longo deste último ano. Os erros remanescentes são de minha responsabilidade, não da deles.

Aos colegas que me acompanharam no laboratório, o meu obrigada por todos, sem excepção, me terem ensinado algo, nas mais diferentes situações. Sem qualquer menosprezo pelos demais, gostaria de deixar um agradecimento especial à Marta Figueiras, por se ter mostrado incansável na ajuda a este trabalho.

Gostaria também de dirigir uma palavra de apreço ao Stefan, pela disponibilidade e simpatia que sempre mostrou e pelas dicas que me deu ao longo dos últimos meses, e à Bia, que tem a minha gratidão profunda pelo apoio vital que me forneceu durante o último ano.

Aos meus amigos remeto o meu carinho e gratidão por me apoiarem ao longo desta fase. Gostaria de agradecer em especial ao Tiago, pelas boas conversas, à Joana Lopes, pela boa-disposição contagiante, à Joana Magalhães, pela sua frontalidade e simpatia, e à Cláudia, por ser uma grande amiga e me aturar em geral.

O meu último agradecimento vai para a minha família: aos avós Sara e Arménio, obrigada pela força moral e por se orgulharem sempre de mim; à minha avó Júlia, pelo seu imenso carinho e disponibilidade; e, finalmente, aos meus pais, Ana e Alfredo, por todo o amor e apoio incondicional que sempre me deram e continuam a dar.

RESUMO

O cancro é uma doença somática que causa milhões de mortes por ano, estimando-se que venham a ser diagnosticados 20,3 milhões de novos casos até 2030.

Os G-quadruplexos (G4) são formas de ADN de maior ordem, que são particularmente relevantes em áreas do genoma como os telómeros, regiões promotoras de oncogenes e promotores de chaperoninas de oncogenes. A estabilização de G4 torna-se, assim, importante no impedimento da progressão de alguns dos eventos que têm o potencial de desencadear o processo neoplásico, uma vez que o ADN deixa de estar na sua forma linear, dificultando o processo de maquinarias como a de transcrição.

As indolo[3,2-*b*]quinolinas são uma de entre muitas classes de compostos que têm vindo a ser estudadas como potenciais estabilizadores de G-quadruplexos, devido à sua estrutura planar, que os torna bons candidatos ao estabelecimento de interações π - π *stacking* com as bases de guanina.

Neste trabalho, é proposta a síntese de um conjunto de derivados tri-substituídos de indolo[3,2-*b*]quinolinas, sua relação estrutura-actividade (SAR) para G4 e modelação *in silico* de modo a prever quais os melhores estabilizadores de G4 para esta classe de compostos.

Os resultados mostraram que o composto **7** (11-oxo-5,10-bis[3-(1-piperidil)propil]indolo[3,2-*b*]quinolina-7-carboxilato de 3-(1-piperidil)propilo) foi o que obteve maiores valores de ΔT_m para os vários tipos de estruturas de G4 testadas. No geral, verificou-se que a introdução de cadeias do tipo propilamina é mais favorável que a de cadeias etilamina. Anéis terminais de piperidina também mostraram ser mais favoráveis, enquanto os anéis de morfolina são desaconselháveis, devido aos diferentes pK_a 's destes grupos terminais.

Estudos de *docking* molecular, usando alguns dos ligandos sintetizados, permitiram a construção de um modelo que permite previsões razoáveis do potencial de estabilização de G4 por parte de derivados de indolo[3,2-*b*]quinolinas. Este método utiliza uma função de *scoring* baseada em ligações de hidrogénio e uma função-padrão London dG como refinamento. Este método permitiu a confirmação das SAR estabelecidas anteriormente.

Palavras-chave: cancro, G-quadruplexos de ADN, estabilização, indolo[3,2-*b*]quinolinas, ligandos tri-substituídos.

ABSTRACT

Cancer is a somatic disease that causes millions of deaths a year. It is estimated that by 2030, 20.3 million new occurrences of this disease will have been diagnosed.

G-quadruplexes (G4) are higher order forms of DNA particularly relevant in areas of the genome such as telomeres or oncogene promoter regions. G4 stabilisation is, therefore, important in the arrest of some events capable of leading to the development of a tumour, since DNA is no longer in its single strand β -conformation, which stalls some of the machinery needed for cell cycle progression.

Indolo[3,2-*b*]quinolines are one of many types of compounds which have been studied as possible stabilisers of G-quadruplexes due to their planar structure, which makes them good candidates for π - π stacking interactions with guanine bases. It has also been shown that the substitution of some positions with protonable alkylamine side chains tends to enhance this stabilisation.

In this work, we propose the synthesis of a series of tri-substituted indolo[3,2-*b*]quinoline derivatives, as well as the establishment of their structure-activity relationship for G4 sequences and *in silico* predictions of stabilisation strengths for this type of compounds.

The results showed that compound **7** (3-(1-piperidyl)propyl-11-oxo-5,10-bis[3-(1-piperidyl)propyl]indolo[3,2-*b*]quinoline-7-carboxylate) was the one to attain higher values of ΔT_m for various types of G4 sequences. In general, it was demonstrated that propylamine chains are preferable to ethylamine ones. Terminal piperidine rings also seem to be favoured for these compounds, as opposed to the not recommended morpholine ones. This is postulated to occur due to the pK_a differences between these terminal groups.

Docking studies using some of the synthesised molecules allowed for the development of a model which can make reasonable predictions for the G4 stabilisation potential of indolo[3,2-*b*]quinoline derivatives, using a scoring function which relies heavily on hydrogen bonding and a general London dG function for refinement. This model allowed for the confirmation of the relationships obtained through the previous SAR studies

Keywords: cancer, DNA G-quadruplexes, stabilisation, indolo[3,2-*b*]quinolines, tri-substituted ligands.

ÍNDICE GERAL

<i>Agradecimentos</i>	<i>V</i>
<i>Resumo</i>	<i>VII</i>
<i>Abstract</i>	<i>IX</i>
<i>Índice Geral</i>	<i>XI</i>
<i>Índice de Esquemas</i>	<i>XIII</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>XIII</i>
<i>Índice de Gráficos</i>	<i>XIV</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>XIV</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>XVI</i>
Capítulo 1. Objectivos do trabalho	1
1. Objectivos do trabalho	3
Capítulo 2. Introdução	5
2. Introdução	7
2.1. O cancro	7
2.2. O ADN, seu polimorfismo e topologias	9
2.2.1. Duplexos de ADN	9
2.2.2. Estruturas de ADN de maior ordem: os G-quadrupeplexos de ADN	10
2.3. Ligandos de G-quadrupeplexos de ADN	14
2.3.1. Aromáticos fundidos	15
2.3.2. Aromáticos não fundidos	19
2.3.3. Macrociclos	21
Capítulo 3. Resultados e discussão	23
3.1. Síntese de derivados tri-substituídos de indolo[3,2- <i>b</i>]quinolinas	25
3.1.1. Síntese do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxílico	25
3.1.2. Alquilação do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxílico	33
3.2. Relação estrutura-estabilização de G-quadrupeplexos de ADN	40
3.3. <i>Docking</i> molecular	48
Capítulo 4. Conclusões	59
Capítulo 5. Procedimentos experimentais	63
5.1. Produtos químicos	65
5.2. Equipamentos	65
5.3. Métodos Gerais	65
5.4. Síntese de derivados de indolo[3,2- <i>b</i>]quinolinas	66
5.4.1. Ácido 2-[2-(bromoacetil)amino]benzoico (22)	66
5.4.2. Ácido 2-{[2-(4-etoxicarbonilanilino)acetil]amino} benzoico (24a)	67
5.4.3. Ácido 2-{[2-(4-trifluorometil)anilino]acetil} aminobenzóico (24b)	68
5.4.4. Ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxílico (19)	69
5.5. Alquilação do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2- <i>b</i>] quinolina-7-	69

carboxílico	
5.5.1. 11-oxo-indolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 2-(dietilamino)etil-5,10-bis[2-(dietilamino)etilo] (1)	70
5.5.2. 11-[2-(dietilamino)etoxi]-10-[2-(dietilamino)etil]indolo [3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 2-(dietilamino)etilo (2)	71
5.5.3. 11-oxo-5,10-bis(2-pirrolidin-1-iletil)indolo[3,2- <i>b</i>] quinolina-7-carboxilato de 2-pirrolidin-1-iletilo (3)	72
5.5.4. 11-(2-pirrolidin-1-iletoxi)-10-(2-pirrolidin-1-iletil) indolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 2-pirrolidin-1-iletilo (4)	73
5.5.5. 5,10-bis(2-morfolinoetil)-11-oxo-indolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 2-morfolinoetilo (5)	75
5.5.6. 11-(2-morfolinoetoxi)-10-(2-morfolinoetil)indolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 2-morfolinoetilo (6)	76
5.5.7. 11-oxo-5,10-bis[3-(1-piperidil)propil]indolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 3-(1-piperidil)propilo (7)	77
5.5.8. 11-[3-(1-piperidil)propoxi]-10-[3-(1-piperidil)propil] indolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxilato de 3-(1-piperidil)propilo (8)	78
5.5.9. 5,10-bis(3-morfolinopropil)-11-oxo-indolo[3,2- <i>b</i>] quinolina-7-carboxilato de 3-morfolinopropilo (9)	79
5.6. Ensaios de estabilização de G-quadruplexos efectuados por desnaturação térmica	80
5.7. <i>Docking</i> molecular	81
Capítulo 6. Referências bibliográficas	83
<i>Anexos</i>	<i>XCIII</i>

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Procedimento sintético para a obtenção do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2- <i>b</i>] quinolina-7-carboxílico (32). a) 1,4-dioxano/DMF (1:1), 0°C → rt, overnight; b) DMF, MW (300W), 140°C, 4h; c) ACN, refluxo, 72 h; d) PPA, 130°C, 2h.	25
Esquema 2: Mecanismo de ciclização proposto para obtenção do composto 32 (80).	31
Esquema 4: Derivados tri-alquilamina do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2- <i>b</i>] quinolina-7-carboxílico (1 a 9).	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Derivados tri-alquilamina do ácido 11-oxo-5,5a,10,10a-tetraindolo[3,2- <i>b</i>]quinolina-7-carboxílico (19) sintetizados neste trabalho.	4
Figura 2: Principais características de um cancro. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2000). (2)	8
Figura 3: Estruturas de ADN duplex. A) A-ADN (PDB ID: 2D47 (29)); B) B-ADN (PDB ID: 1BNA (30)); C) Z-ADN (PDB ID: 3P4J (28)).	10
Figura 4: Tétrade de guanina com um catião no centro. Adaptado de Murat, <i>et al.</i> (2011) (33).	11
Figura 5: G-quadruplexo estabilizado por iões K ⁺ . (36)	12
Figura 6: Topologias de G-quadruplexos intramoleculares. A) Antiparalela; B) Paralela; C) e D) Híbridas. Adaptado de Neidle (2009). (4)	13
Figura 7: Estruturas da criptolepina (10) e da quindolina (11), do composto 12 , sintetizado por Caprio, <i>et. al.</i> (2000) (55), e do composto 13 , sintetizado por Guyen, <i>et. al.</i> (2004) (60).	16
Figura 8: Melhor composto sintetizado por Zhou, <i>et. al.</i> (2005) (N-(10 <i>H</i> -indolo[3,2- <i>b</i>]quinolin-11-il)-N',N'-dimetil-propan-1,3-diamina) (61).	17
Figura 9: 2,6-diamidoantraquinona usada no estudo de Sun, <i>et al.</i> (1997). (71)	18
Figura 10: Estrutura geral das acridinas tri-substituídas usadas no trabalho de Harrison, <i>et. al.</i> (1999). (72) Adaptado de Tan, <i>et al.</i> (2008). (52)	19
Figura 11: Derivados de bisdenzimidazole. (74, 76, 77)	20
Figura 12: Derivado de bisarildiceteno. (75)	20
Figura 13: Estruturas da telomestatina e do ligando HXDL. (78)	21
Figura 14: Estrutura do ligando TMPyP4.	22
Figura 15: Estrutura do ciclofano de poliamónio BOQ ₁ . (78)	22
Figura 16: Desvios químicos e interações visíveis nos espectros de ¹ H e COSY para o composto 27 .	26
Figura 17: Desvios químicos e interações visíveis nos espectros de ¹ H e COSY para o composto 30 .	28
Figura 18: Composto 31 com posições numeradas.	30

Figura 19: Desvios químicos e interações visíveis nos espectros de ^1H e COSY para o composto 32	32
Figura 20: Resumo dos desvios químicos e interações para o composto 1	35
Figura 21: Perfis de desnaturação para os sais dos compostos 1 (A) , 2 (B) , 3 (C) , 4 (D) , 6 (E) , 7 (F) e 8 (G) , para as concentrações de 0.5, 1, 2, 3, 4 e 5 μM	41
Figura 22: Esquematização das posições N' , N'' e N''' para compostos N,N, COOR- e N,O,COOR- substituídos.....	43
Figura 23: Resumo das relações estrutura-actividade para a série de indoloquinolinas tri-substituídas testada.	45
Figura 24: Compostos testados pelo grupo de de Cian (2007). (86) A) BRACO-19; B) PIPER; C) Telomestatina; D) TMPyP4.	46
Figura 25: Estruturas de G-quadruplexos teloméricos utilizadas. A) Antiparalela (143D) (88); B) Híbrida (2JPZ) (45); C) Paralela (1KF1) (44).	48
Figura 26: Representação da interação de menor energia entre o ligando 7 e a estrutura 143D na série London-London.....	50
Figura 27: Interações do ligando 3 com a estrutura 1KF1.	51
Figura 28: Interações do ligando 3 com a estrutura 2JPZ.	53
Figura 29: Representação esquemática das interações entre os ligandos 7 e 8 e as estruturas de G-quadruplexos teloméricos 1KF1 e 2JPZ. A) Ligando 7 , 1KF1; B) Ligando 7 , 2JPZ; C) Ligando 8 , 1KF1; D) Ligando 8 , 2JPZ; E) Ligando 7 , 1KF1, representação das interações a três dimensões.	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Correlação entre pK_a e ΔT_m para cada cadeia azotada terminal, para o G4 da região promotora da chaperonina de oncogenes <i>HSP90A</i>	44
Gráfico 2: Resultados da validação do método Alpha HB (5-4)/London.	54
Gráfico 3: Resultados da validação do método Alpha HB (2-4)/London.	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto 27	26
Tabela 2: Condições reacionais utilizadas na obtenção do composto 30	27
Tabela 3: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto 30	29
Tabela 4: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto 31	30
Tabela 5: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto 32	32
Tabela 6: Condições reacionais utilizadas na obtenção dos produtos 1 a 9 e rendimentos relativos a cada um dos produtos isolados.....	34

Tabela 7: Atribuição dos desvios químicos (em ppm) de ^1H e ^{13}C para os compostos 1 a 9 .	38
Tabela 8: Diferencial nas temperaturas de fusão dos diferentes G-quadruplexos e da cadeia de ADN duplex para os compostos 1-4 e 6-8 à concentração de 2 μM .	42
Tabela 9: pK_a teórico dos grupos azotados da molécula, obtido pelo programa SPARC (v. 4.6) (85).	42
Tabela 10: Resultados obtidos por de Cian, <i>et. al.</i> , (86) para compostos estabilizadores de G-quadruplexos, à concentração de 1 μM e usando o nucleótido F21T, por FRET.	46
Tabela 11: Percentagens totais de interações presentes para os cálculos iniciais.	49
Tabela 12: Percentagem de interações π -catião para a estrutura 1KF1.	52
Tabela 13: Percentagens para cada tipo de interação verificada usando o método Alpha HB (2-4)/London dG.	56
Tabela 14: Condições reaccionais utilizadas na obtenção do composto 30 .	68
Tabela 15: Manchas maioritárias obtidas após PTLC primária do composto 1 .	70
Tabela 16: Manchas obtidas após PTLC secundária do composto 1 .	70
Tabela 17: Manchas obtidas após PTLC primária do composto 3 .	72
Tabela 18: Manchas obtidas após PTLC secundária (R_F 0,2) do composto 3 .	73
Tabela 19: Manchas obtidas após PTLC secundária (R_F 0,4) do composto 4 .	74
Tabela 20: Manchas obtidas após PTLC terciária (R_F 0,7 da PTLC secundária a R_F 0,4) do composto 4 .	74
Tabela 21: Manchas obtidas após PTLC primária do composto 5 .	75
Tabela 22: Manchas obtidas após PTLC secundária do composto 6 .	76
Tabela 23: Manchas obtidas após a PTLC primária do composto 7 .	77
Tabela 24: Manchas obtidas após a PTLC secundária do composto 7 .	77
Tabela 25: Manchas obtidas após PTLC secundária (R_F 0,4) do composto 8 .	78
Tabela 26: Manchas obtidas após PTLC primária do composto 9 .	79
Tabela 27: Manchas obtidas após segunda PTLC primária do composto 9 .	80
Tabela 28: Manchas obtidas após PTLC secundária do composto 9 .	80

ABREVIATURAS

A	Adenina
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHB	Função Alpha HB
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
C _{quat}	Carbono quaternário
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear de próton
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dA	Deoxi-adenosina
dC	Deoxi-citidina
dd	Dupleto de dupletos
dG	Deoxi-guanidina
dT	Deoxi-timidina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ds	Cadeia dupla
eq.	Equivalente(s)
EtOH	Etanol
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Förster
F1	Coordenadas de frequência da primeira dimensão em RMN bidimensional
F2	Coordenadas de frequência da segunda dimensão em RMN bidimensional
G	Guanina
G4	G-quadruplexo
Hex	Hexano
HMBC	Espectroscopia de correlação heteronuclear a ligações múltiplas
HMQC	Espectroscopia de correlação heteronuclear múltiplo-quântica
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kb	quilobase
L	Função London dG

m	multiplete
M	Molar
MeOH	Metanol
N/A	Não se aplica
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
p.f.	Ponto de fusão
PPA	Ácido polifosfórico
ppm	Partes por milhão
PTLC	Cromatografia preparativa em camada fina (do inglês <i>preparative thin layer chromatography</i>)
q	Quarteto
quint	Quintuplete
RMN (^1H -, ^{13}C -)	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (de próton, de carbono-13)
r.t.	Temperatura ambiente (do inglês <i>room temperature</i>)
R^2	Coefficiente de distribuição
s	Singuleto
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês <i>structure-activity relationship</i>)
st.	Alongamento (do inglês <i>stretching</i>)
t	Tripleto
T	Timina
TEA	Trietilamina
TFO	Oligonucleótido formador de triplexos
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>thin layer chromatography</i>)
δ	Desvio químico
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔT_m	Diferencial da temperatura de fusão
η	Rendimento

OBJECTIVOS DO TRABALHO

1. OBJECTIVOS DO TRABALHO

Apesar das evoluções na medicina durante os séculos XX e XXI, o cancro permanece uma ameaça a combater. (1–3) Um possível alvo terapêutico a abordar na terapia anti-tumoral são os G-quadruplexos, estruturas de ADN ou ARN formadas por tétrades de guanina e estabilizadas por catiões monovalentes. (4–6) Os G-quadruplexos têm tendência a formar-se em zonas do genoma contendo sequências repetidas de guanina, como as encontradas, por exemplo, em regiões promotoras de oncogenes ou chaperoninas de oncogenes, e nos telómeros. (4) Consequentemente, a estabilização deste tipo de estruturas será benéfica na prevenção da transcrição de oncogenes e da acção de enzimas como a telomerase, geralmente sobre-expressas no cancro. (7)

As estruturas existentes de agentes estabilizadores de G-quadruplexos demonstram que estes são, na sua generalidade, moléculas que contêm sistemas aromáticos com vários anéis, fundidos ou não, de forma a favorecer interacções do tipo π - π *stacking* com as tétrades de guanina. Alguns destes compostos apresentam também grupos protonáveis a pH fisiológico, de modo a poderem estabelecer ligações de hidrogénio com os G-quadruplexos. (8) As indolo[3,2-*b*]quinolinas são um grupo de compostos que, pela sua estrutura aromática e por poderem suportar diferentes tipos de derivatização, se tornam atractivas como núcleo central para ligandos de G-quadruplexos. (9)

O principal objectivo deste trabalho é o estudo da relação entre a estrutura das cadeias alquilamina de indoloquinolinas tri-substituídas e a estabilização selectiva de G-quadruplexos de ADN. Assim, é primeiramente proposta a síntese (**3.1. Síntese de derivados tri-substituídos de indolo[3,2-*b*]quinolinas**) de um conjunto de derivados tri-substituídos da indolo[3,2-*b*]quinolina **32** (ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*]quinolina-7-carboxílico) com diferentes grupos substituintes contendo cadeias etilamina ou propilamina e diferentes grupos azotados terminais.

A segunda secção de resultados (**3.2. Relação estrutura-estabilização de G-quadruplexos de ADN**) visa estabelecer relações de estrutura-actividade (SAR) através da análise dos resultados da estabilização de G-quadruplexos e selectividade em relação a ADN duplex pelos compostos **1-4** e **6-8**, através da medição do ΔT_m para dos vários oligonucleótidos Na última parte deste trabalho (**3.3. Docking molecular**) pretende-se estudar as interacções destes ligandos com estruturas de G-quadruplexos teloméricos por modelação molecular.

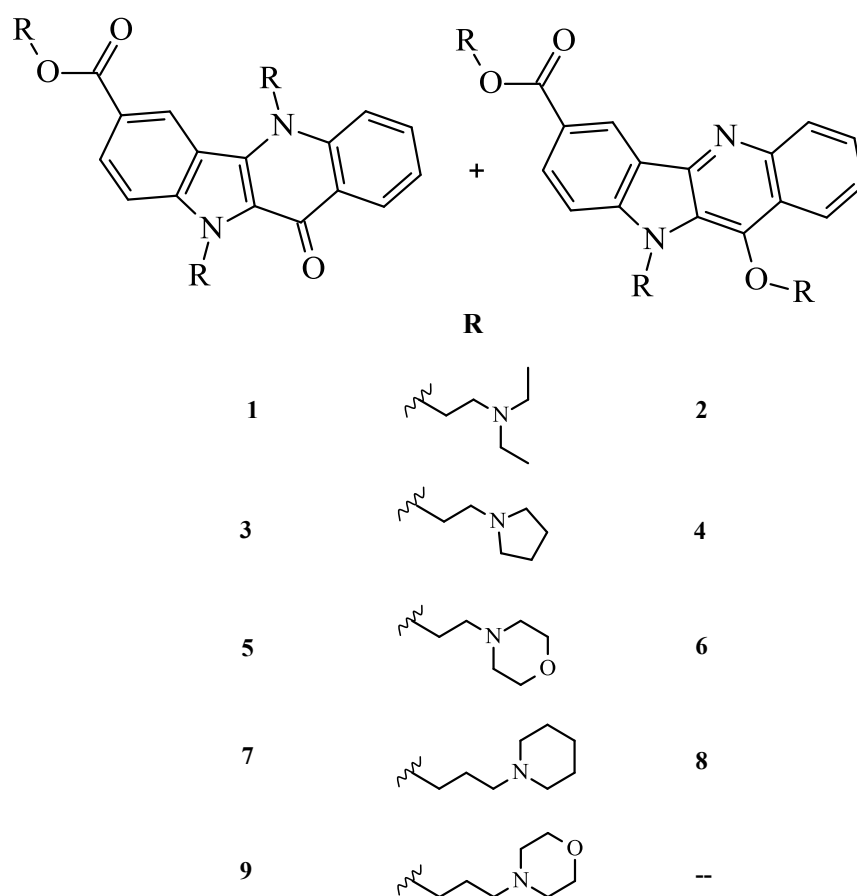


Figura 1: Derivados tri-alquilamina do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*]quinolina-7-carboxílico (**32**) sintetizados neste trabalho.

INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

2.1. O CANCRO

No último século, a Humanidade conseguiu descobrir curas para muitas doenças infecciosas outrora letais. Contudo, outras doenças, maioritariamente aquelas com génese na desregulação celular, como o cancro, vieram tomar o seu lugar como causas primárias de morte prematura nos países desenvolvidos. (1) No ano de 2008, foram diagnosticados 12,7 milhões de novos casos, tendo ocorrido cerca de 7,6 milhões de mortes relacionadas com esta patologia, e estima-se que o cancro venha a causar 13,2 milhões de mortes até ao ano 2030, resultantes do diagnóstico de 20,3 milhões de novos casos. (10)

O cancro pode ser descrito como uma doença somática que envolve alterações dinâmicas ao nível do genoma. (2) A dinâmica depende, em parte, do facto de esta doença envolver factores ambientais e dependentes do estilo de vida do indivíduo. Como consequência, as formas mais prevalentes de cancro diferem significativamente entre os países desenvolvidos e os em vias de desenvolvimento. (3) De igual modo, factores como o sexo do indivíduo, a obesidade, factores hormonais, doenças infecciosas e exposição ocupacional a carcinogénicos podem também desempenhar papéis importantes no desenvolvimento de uma neoplasia. (2, 3)

Ao nível biológico, o cancro pode ser definido como a proliferação descontrolada de células. (2) Para a ocorrência desta proliferação desmesurada podem contribuir diversos mecanismos, tais como a aquisição de auto-suficiência por parte de factores de crescimento, a aquisição de potencial replicativo ilimitado ou a capacidade de evadir a apoptose. (1) Segundo Hanahan e Weinberg (2000) (2), o desenvolvimento de tumores depende de seis características principais, como demonstrado na **Figura 2**.

Além das características descritas na **Figura 2**, Hanahan e Weinberg (2011) consideram duas outras características das células tumorais, a desregulação do sistema energético celular e a evasão à destruição por parte do sistema imunitário. (11) Duas outras características são ainda designadas como permissivas do aparecimento de neoplasias: fenómenos de inflamação e a instabilidade do genoma e suas mutações. (11, 12)

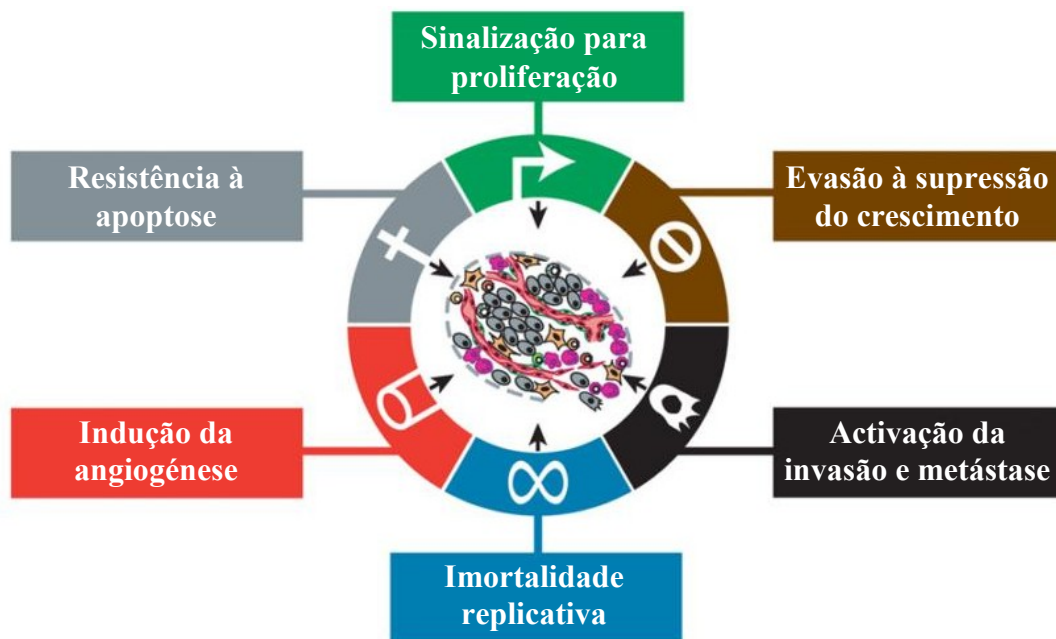


Figura 2: Principais características de um cancro. Adaptado de Hanahan e Weinberg (2000). (2)

As células cancerígenas tendem a sobreviver em condições extremas, como hipoxia ou acidose, levando à geração de radicais livres que podem causar danos nas proteínas celulares. Por este motivo, as células tumorais são propensas à sobre-expressão de chaperoninas que colmatem estes efeitos e assegurem a continuidade da replicação celular. (13) Outro facto conhecido sobre o cancro é o desenvolvimento progressivo que este implica, devido à acumulação sucessiva de mutações. (14) A instabilidade genómica está intimamente ligada a regiões designadas como oncogenes, regiões de ADN codificante em que uma mutação pode implicar perda ou alteração da actividade da proteína resultante, causando desregulações importantes no ciclo celular. (15)

As sucessivas replicações do ADN originam igualmente o encurtamento dos telómeros, complexos entre ADN e proteínas que protegem as extremidades dos cromossomas eucarióticos de fenómenos como a degradação, recombinação ou fusão entre cromossomas. Os telómeros humanos são altamente conservados e constituídos por 10 a 15 kilobase (kb) de sequências repetidas de TTAGGG/AATCCC em dupla hélice, terminando numa extensão de cadeia simples rica em guaninas sucessivas. (16–18) Tanto a região de cadeia simples como a de cadeia dupla funcionam como locais de ligação de proteínas especializadas que asseguram a protecção da extremidade do cromossoma e, conseqüentemente, da informação genética contida em toda a estrutura. (19) Uma vez que o ADN telomérico não é codificante, o encurtamento dos telómeros é tolerado até certo limite (limite de Hayflick), após o qual a célula entra em senescência, dado não possuir mecanismos de regeneração dos telómeros. (20) Contudo, verifica-se que em cerca de 85% das células tumorais existe a expressão de telomerase, uma

ribonucleoproteína que compensa a perda de bases nos telómeros, evadindo a apoptose e immortalizando efectivamente a célula. (21, 22)

A lista de potenciais alvos terapêuticos na terapia anti-tumoral é extensa, pelo que se torna difícil seleccionar abordagens. (23) Contudo, os casos citados acima possuem em comum a possibilidade de formação de um tipo de potenciais alvos terapêuticos contra o cancro: G-quadruplexos. (24)

2.2. O ADN, SEU POLIMORFISMO E TOPOLOGIAS

2.2.1. DUPLEXOS DE ADN

O ácido desoxirribonucleico (ADN) é a molécula que contém a informação genética de um indivíduo, sendo geralmente conhecido pela sua estrutura em dupla hélice (ADN duplex), com emparelhamento de bases Watson-Crick. A forma de ADN duplex mais estável em condições fisiológicas e, conseqüentemente, mais comum é o B-ADN, com enrolamento para a direita e em que os pares de bases se encontram dispostos perpendicularmente à dupla hélice. (25)

Contudo, existem duas outras formas de ADN duplex: A-ADN e Z-ADN. (26) O A-ADN difere do B-ADN no espaçamento entre pares de bases, formando uma estrutura muito mais compacta e ordenada em meios de baixa humidade relativa. Ao contrário do que sucede com estruturas de B-ADN, o A-ADN tende a ter as suas bases azotadas desviadas do eixo helicoidal, levando ao aumento da *sulco maior* e diminuição da *sulco menor*. (27) A formação de Z-ADN está relacionada com a predominância de purinas e pirimidinas alternadas na sequência onde se forma, especialmente d(CG)_n. (26) O Z-ADN possui enrolamento para a esquerda e, ao contrário do que se verifica para os dois polimorfos anteriores, não possui todas as suas bases azotadas na posição *syn* em relação às respectivas pentoses, mas sim uma mistura de *syn* e *anti* que lhe confere uma estrutura em ziguezague. (27) A sua estrutura tem como resultado uma menor flexibilidade conformacional em relação ao B-ADN. (28)

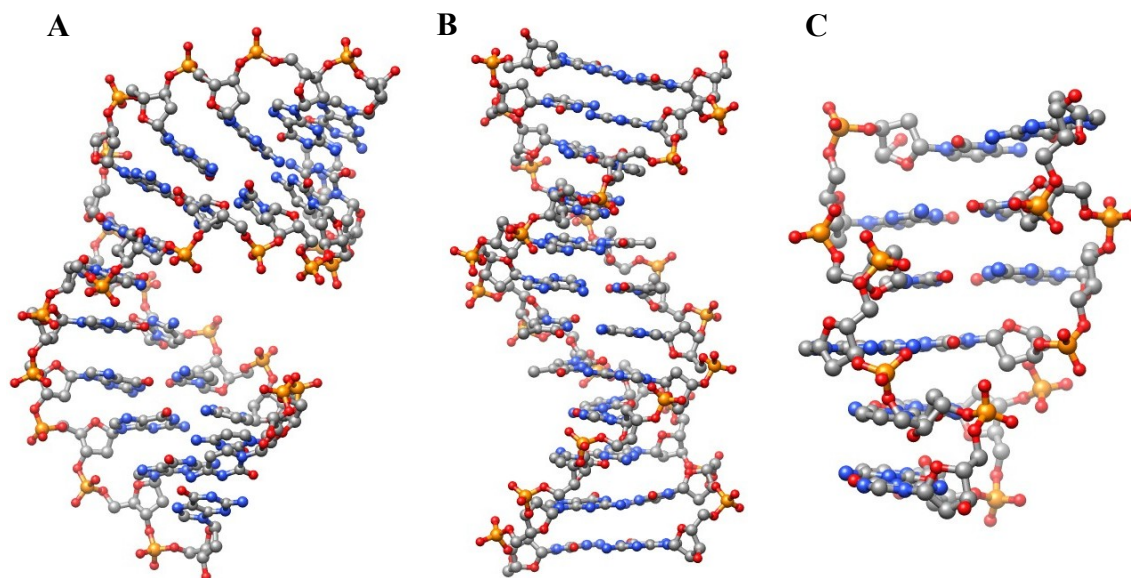


Figura 3: Estruturas de ADN duplex. **A)** A-ADN (PDB ID: 2D47 (29)); **B)** B-ADN (PDB ID: 1BNA (30)); **C)** Z-ADN (PDB ID: 3P4J (28)).

Em contraste com estruturas macromoleculares proteicas, o ADN é uma molécula extremamente versátil e conformacionalmente diversa. (27) A diferença nos seus conteúdos de bases dá origem a diversas topologias, envolvendo uma ou mais moléculas, e que podem gerar estruturas alternativas ao ADN duplex. (26)

2.2.2. ESTRUTURAS DE ADN DE MAIOR ORDEM: OS G-QUADRUPLLEXOS DE ADN

Para além do duplex, existem topologias de maior ordem frequentemente adoptadas pela molécula de ADN, sendo os mais frequentes:

- 1) Triplexos: são constituídos por uma dupla hélice com uma terceira cadeia ligada ao sulco maior. (31) A formação de triplexos paralelos não é favorecida a pH fisiológico, sendo que as sequências de oligonucleótidos formadores de triplexos (TFO) podem originar também agregados de G-quadruplexos (25, 26);
- 2) I-motifs: formados por resíduos de citidina que se associam em forma de duplex paralelo, formando pares $C\cdot CH^+$. Cada um destes duplexos associa-se antiparalelamente de modo a formar quadruplexos a pH ácido ou neutro (26, 32);
- 3) G-quadruplexos (26).

Os G-quadruplexos de ADN são estruturas de maior ordem constituídas por empilhamentos de núcleos de deoxi-guanidina ligados entre si por ligações de Hoogsteen de modo a formar tétrades, como representado na **Figura 4**. (33)

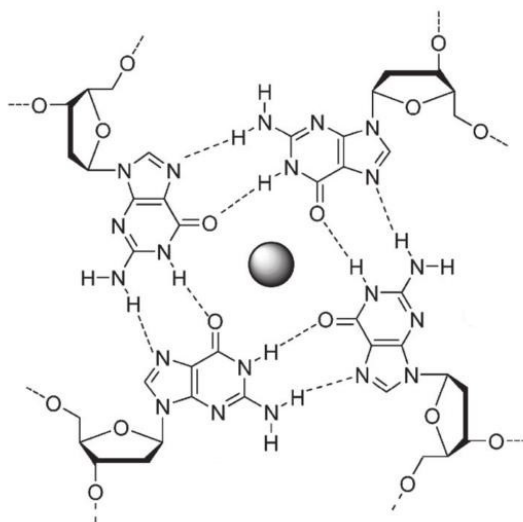


Figura 4: Tétrade de guanina com um cátion no centro. Adaptado de Murat, *et al.* (2011) (33).

As oito ligações de Hoogsteen presentes numa tétrade de guanina são estabelecidas entre os prótons amino e imino de uma base e os átomos de azoto N7 e de oxigénio O6 da outra, respectivamente, ajudando a estabilizar a estrutura. (34, 35) Um outro factor importante de estabilização dos G-quadruplexos é a presença de cátions, geralmente monovalentes, intercalados entre as tétrades de guanina. O posicionamento destes cátions no canal central que se forma dentro do G-quadruplexo permite uma estabilização adicional, por coordenação dos cátions com os átomos O6 das tétrades de guanina superiores e inferiores. (4) A distribuição espacial pode ser observada na **Figura 5** (36), que mostra um G-quadruplexo estabilizado por cátions potássio.

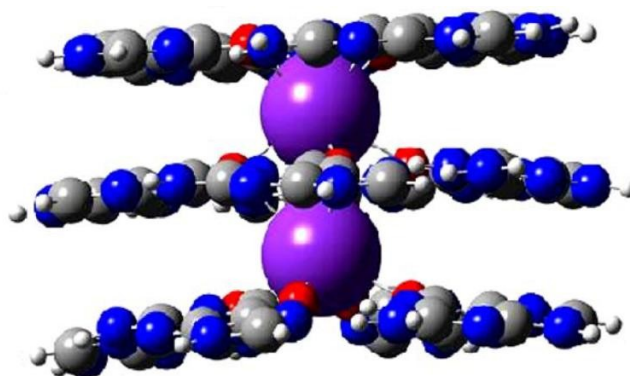


Figura 5: G-quadruplexo estabilizado por íons K^+ . (36)

A estabilização não é, contudo, a mesma para todos os íons monovalentes, verificando-se a ordem $K^+ > NH_4^+ > Na^+ > Li^+$. (33, 37) As elevadas concentrações intracelulares de potássio, em particular, fazem com que este seja o catião estabilizador com mais relevância, o que, aliado ao seu raio iônico, faz com que seja o melhor estabilizador de entre os quatro listados e, conseqüentemente, um dos catiões mais usados para induzir a formação de G4 em solução. (38–41) Mita, *et al.* (2006) estudaram também os efeitos dos íons divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} na estabilização de G4, concluindo que a presença destes íons pode contribuir para a estabilização através da promoção de fenômenos de dimerização de G-quadruplexos devido à supressão da repulsão electrostática entre monómeros por coordenação com o átomo de azoto N7. (42)

Os G-quadruplexos possuem alguma variedade nas suas topologias, podendo ser uni, bi ou tetramoleculares. (43) Os G4 tetramoleculares são formados por quatro cadeias distintas, sendo que cada uma delas contém pelo menos uma sequência de guaninas. Por seu turno, G4 bimoleculares contêm duas cadeias diferentes, cada uma com duas sequências de guanina (por exemplo, d(G₄T₄G₄), enquanto os G-quadruplexos unimoleculares ou intramoleculares são constituídos por uma só cadeia com pelo menos quatro sequências de dG. (4)

Os G4 intramoleculares podem organizar-se segundo três tipos principais de estrutura:

- 1) Antiparalelos: a progressão da cadeia alterna entre um sentido e outro, fazendo um padrão 2+2 (4) (**Figura 6, A**);
- 2) Paralelos: a progressão da cadeia é feita sempre no mesmo sentido, criando ansas de reversão da orientação da cadeia (4, 44) (**Figura 6, B**);
- 3) Híbridos: são topologias de G-quadruplex em que a progressão na cadeia é feita sempre no mesmo sentido, à excepção de um dos lados. (4, 45) (**Figura 6, C e D**).

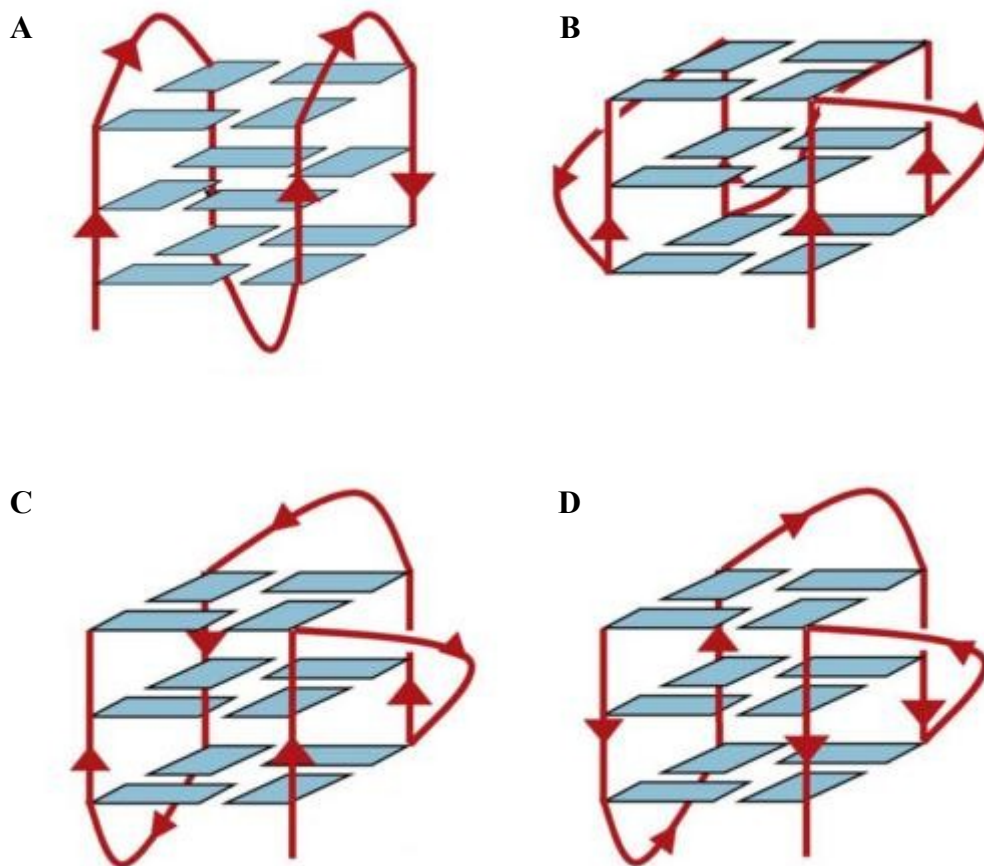


Figura 6: Topologias de G-quadruplexos intramoleculares. **A)** Antiparalela; **B)** Paralela; **C)** e **D)** Híbridas. Adaptado de Neidle (2009). (4)

A existência de quatro sequências de guanina implica a formação de, pelo menos, três ansas constituídas pelos nucleótidos que separam essas sequências umas das outras. Pela **Figura 6**, é possível observar a existência de dois tipos de ansas, as de reversão da cadeia, que ligam diagonalmente duas sequências adjacentes com a mesma orientação, e as restantes, que fazem a ligação entre sequências de orientações opostas. Podem ainda ocorrer outros tipos de ansas menos usuais, como as ansas internas. (37)

No contexto biológico, é relevante a tendência à formação de estruturas de G-quadruplexos paralelas na presença de íons potássio, o cátion monovalente com mais relevo no meio intracelular. Por seu turno, a formação de estruturas antiparalelas é desfavorecida no meio intracelular, tendo estas estruturas tendência a formar-se em meios com elevadas concentrações de sódio. (46) A multimerização de G-quadruplexos é também improvável, pelo que os G4 monoméricos se tornam mais relevantes. (37) Ao

nível do genoma, a formação de G-quadruplexos requer a existência prévia de uma cadeia simples de ADN. Assim, é necessária a actuação de helicases sobre o ADN duplex. Estudos da sequência genómica demonstram, de resto, a existência de sequências potencialmente formadoras de G-quadruplexos em alguns sítios de ligação de helicases. (47)

Uma das regiões mais relevantes em termos da existência de sequências passíveis de formar G-quadruplexos é o telómero. Como referido na secção 2.1. **O cancro**, a expressão de telomerase permite a regeneração infinita dos telómeros, mesmo que os cromossomas já não se encontrem viáveis, após entre 20 a 40 divisões celulares. O processo da extensão do telómero envolve primeiramente a hibridização da sequência de ADN simples do telómero com o ARN presente num dos domínios da telomerase, de modo a sintetizar a sequência telomérica complementar. A formação de G-quadruplexos nesta região constitui, portanto, um entrave à acção da telomerase, uma vez que não restam sequências de ADN simples de telómero para reconstituir o mesmo e/ou dar continuidade ao alongamento. (48)

Muitas sequências potencialmente geradoras de G4 podem também ser encontradas em regiões de promotores de oncogenes, como *KRAS*, *c-KIT* ou *c-MYC*. A possibilidade de formação de G-quadruplexos nestes promotores é extremamente importante neste tipo de casos, uma vez que Cogoi, *et. al.* (2006) provaram que este tipo de evento está directamente ligado ao bloqueio da acção da ADN polimerase e, consequentemente, à paragem da maquinaria de transcrição destes genes. (49) De igual modo, eventos semelhantes ocorrem em promotores de chaperoninas de oncogenes, como é o caso da HSP90. (50, 51)

A formação de G-quadruplexos *in vivo* tem sido alvo de discussão, pelo que a aplicação de estratégias de estabilização dos mesmos não é consensual. No início deste ano, Biffi, *et. al.* utilizaram um anticorpo especificamente desenhado para detectar G-quadruplexos e demonstraram pela primeira vez a sua presença em células humanas, dando crédito às possibilidades terapêuticas de ligandos estabilizadores de G4. (47)

2.3. LIGANDOS DE G-QUADRUPLEXOS DE ADN

Uma vez que, ao contrário das células normais, a maioria das células cancerígenas apresenta sobre-expressão de oncogenes e elevada actividade da telomerase, os G-quadruplexos tornam-se alvos atractivos para interacção selectiva com o DNA em células tumorais. Os compostos desenhados para este efeito visam, especificamente, a inibição da telomerase ou a inactivação da actividade transcripcional de oncogenes. (52) O desenvolvimento de ligandos selectivos para G-quadruplexos tem, assim, sido uma tendência na investigação de novos compostos anti-tumorais, sendo os compostos desenhados de modo a otimizar as interacções que possam estabelecer com os G4. (53)

Uma característica comum em ligandos de G-quadruplexos é a existência de uma zona planar aromática passível de estabelecer interações π - π *stacking* com os anéis dos quartetos de guanina. (53, 54) Esta característica desejável pode traduzir-se através da incorporação de anéis aromáticos, fundidos ou não, ou de sistemas macrocíclicos que efectuem semelhante função. (52) A incorporação de cadeias laterais básicas é também comum no desenvolvimento de ligandos estabilizadores de G-quadruplexos. (55)

2.3.1. AROMÁTICOS FUNDIDOS

2.3.1.1. Indoloquinolinas

A espécie *Cryptolepis sanguinolenta*, um arbusto geralmente encontrado na África Ocidental, tem sido desde há muito usada na medicina tradicional Ganesa no tratamento de febres e controlo de alguns tipos de infecção. Estas propriedades são devidas ao seu conteúdo em indoloquinolinas, especialmente a criptolepina (5-metil-5*H*-indolo[3,2-*b*]quinolina), que em condições acídicas existe sob a forma de sal. (55, 56)

As indoloquinolinas são compostos tetracíclicos planares de origem natural que possuem um núcleo de indole e outro de quinolina. As indolo[3,2-*b*]quinolinas, em particular, têm vindo a atrair a atenção nos últimos anos como possíveis estabilizadores de G4 pela sua estrutura tetracíclica planar que permite a introdução de substituintes de modo a formar ligandos protonáveis *in situ* ou N-metilados. Aliado ao facto de o seu tetraciclo não ser simétrico, estes compostos permitem a construção de bibliotecas quimicamente diversas de potenciais ligandos de G-quadruplexos. (9, 54, 57)

O primeiro estudo relativo à derivatização indolo[3,2-*b*]quinolinas como estabilizadores de G4 usou derivados de criptolepina e quindolina (10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolina), tendo sido efectuado por Caprio, *et. al.* (2000). Este estudo permitiu concluir que a criptolepina não demonstrava selectividade entre G4 e ADN duplex, sendo que poderia, no entanto, ser usada como *lead* para a geração de novas bibliotecas de compostos. A melhor indoloquinolina resultante do estudo foi o composto **12** (2-[10-[2-(dimetilamino)etil]indolo[3,2-*b*]quinolin-2-il]-N,N-dimetil-etanamina), com um ^{tel}IC₅₀ de 16 μ M. (55) Corroborando este estudo, após a obtenção de uma estrutura cristalográfica mostrando um núcleo de criptolepina intercalado com uma sequência d(CCTAGG)₂ pelo grupo de Lisgarten (2002) (58), Guittat, *et. al.* (2003) demonstraram a maior afinidade desta molécula para estruturas de ADN triplex e duplex, comparativamente aos G-quadruplexos. (59)

Um estudo subsequente realizado por Guyen, *et. al.* (2004), envolvendo estudos de modelação molecular, permitiu estabelecer que padrões de dialquilação de indolo[3,2-*b*]quinolinas geravam compostos com maior potencial de estabilização de G4 que o composto de partida. De facto, um dos compostos, possuindo anéis terminais de pirrolidina e um espaçador propilo (**13**, 2,10-bis(3-pirrolidin-1-ilpropil)indolo[3,2-

b]quinolina) apresentava um $^{tel}IC_{50}$ menor que o obtido no estudo anterior (6,3 μ M), com um ΔT_m de 20°C à concentração de 2,9 μ M de composto. (60)

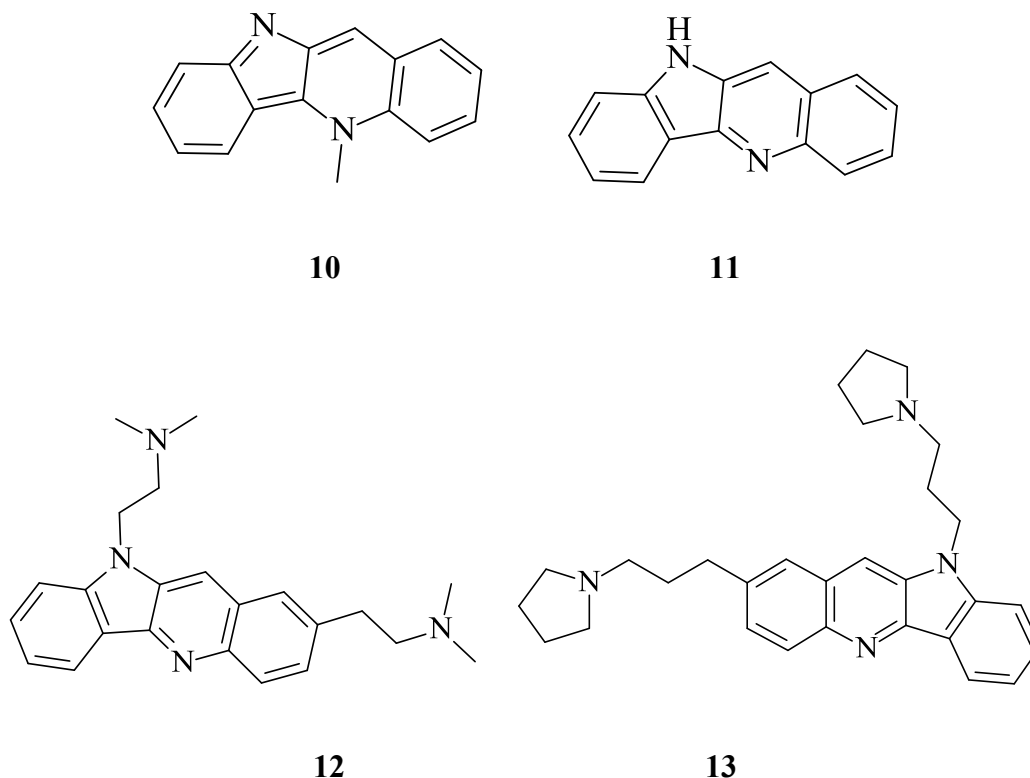
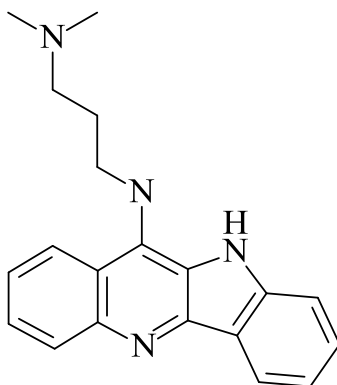


Figura 7: Estruturas da criptolepina (**10**) e da quindolina (**11**), do composto **12**, sintetizado por Caprio, *et. al.* (2000) (55), e do composto **13**, sintetizado por Guyen, *et. al.* (2004) (60).

No ano seguinte, Zhou, *et. al.* (2005) usaram uma biblioteca de derivados de quindolina de maiores dimensões, demonstrando que a introdução de grupos dadores de electrões na posição 11 conduzia a um aumento significativo da densidade electrónica junto ao átomo N5, o que resultava numa maior facilidade de protonação a pH fisiológico. Os compostos resultantes possuíam uma maior capacidade de indução da formação de G4 e de estabilização dos mesmos, inibindo consequentemente a telomerase, sendo que o melhor apresentava um $^{tel}IC_{50}$ de 0,44 μ M e um ΔT_m de 21°C para G4 telomérico (**14**). (61) O mesmo grupo identificou dois anos depois este conjunto de compostos como estabilizando também sequências geradoras de G4 presentes nas regiões promotoras do oncogene *c-MYC*. Ou, *et. al.* (2007) referem também que a presença de um grupo amina na cadeia lateral reforça a estabilização electrostática entre os derivados de quindolina e os grupos fosfato da cadeia do G4, ajudando à estabilização global dos G-quadрупlexos. (62)



14

Figura 8: Melhor composto sintetizado por Zhou, *et. al.* (2005) (N-(10*H*-indolo[3,2-*b*]quinolin-11-il)-N',N'-dimetil-propan-1,3-diamina) (61).

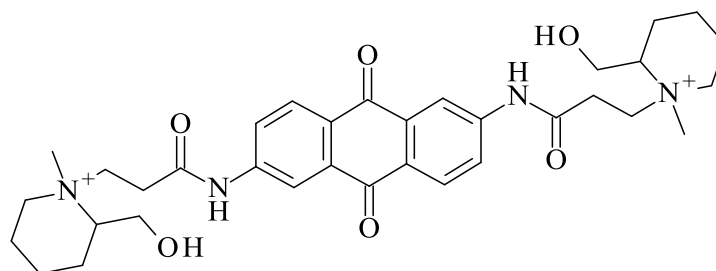
Com base nas descobertas efectuadas neste tipo de estudos, o desenho de ligandos de G4 popularizou-se, aumentando as bibliotecas de possíveis derivados de indoloquinolinas com contribuições baseadas nos núcleos de criptolepina, neocriptolepina e quindolina. (52, 63–66) Recentemente, Lavrado, *et al.* (2013) testaram uma biblioteca de compostos com uma, duas ou três substituições alquilamina em derivados de indolo[3,2-*b*]quinolin-11-onas, sintetizadas pelo método modificado de Görlitzer e Weber. (67, 68)

O grupo de Lavrado concluiu que existia uma distância óptima entre o núcleo de indolo[3,2-*b*]quinolina e o centro básico existente nos substituintes, traduzindo-se sob a forma de uma cadeia linear propilo, sendo que a basicidade das cadeias era determinante para a actividade dos compostos enquanto estabilizadores de G4, estabelecendo assim a base para este trabalho. (69)

2.3.1.2. Antraquinonas

Os análogos de antraquinonas foram originalmente desenvolvidos para interagirem com o ADN enquanto citotóxicos (70), sendo que Sun, *et al.* (1997) já haviam desenvolvido 2,6-diamidoantraquinonas que provaram possuir afinidade para triplexos de ADN, em relação ao ADN duplex. Este grupo veio a estabelecer a relação entre ligandos estabilizadores de G4 e a inibição da telomerase, seguindo alguns estudos de modelação molecular que apontavam para que este tipo de compostos pudesse interagir com G4 através de intercalação. (70, 71) Contudo, as amidoantraquinonas provaram não ser, por si só, suficientemente grandes para estabilizar efectivamente G4. Apesar de terem sido sintetizados derivados de diamidoantraquinonas que provaram ser

estabilizadores potentes de G4, este tipo de compostos não possui boas selectividades para G4 em relação a ADN duplex, pelo que não constituem bons candidatos a *leads* para o desenvolvimento de bibliotecas de ligandos potencialmente estabilizadores de G-quadruplexos. (48)

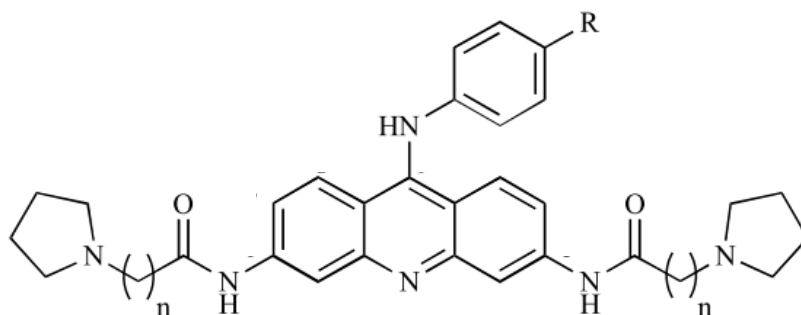


15

Figura 9: 2,6-diamidoantraquinona usada no estudo de Sun, *et al.* (1997). (71)

2.3.1.3. Acridinas

Enquanto ligandos de G-quadruplexos, as acridinas começaram por não obter maiores selectividades para G4 em relação ao ADN duplex quando comparadas com as antraquinonas. Inicialmente Harrison, *et al.* (1999) sintetizaram derivados contendo uma carga positiva central ao cromóforo, que falharam no seu objectivo devido à parca alcalinidade do átomo de azoto introduzido. Este problema foi colmatado através da introdução de um terceiro grupo substituinte no anel, de modo a aumentar a alcalinidade do átomo de azoto. Contudo, tal como as antraquinonas, as acridinas possuem problemas de selectividade entre G4 e ADN duplex. (52, 72)



16

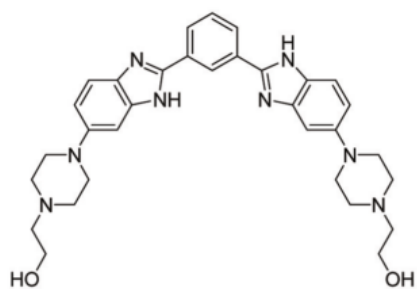
Figura 10: Estrutura geral das acridinas tri-substituídas usadas no trabalho de Harrison, *et. al.* (1999). (72) Adaptado de Tan, *et al.* (2008). (52)

O trabalho publicado por Redman, *et al.* (2009) trouxe à luz a potencialidade de discernimento entre estruturas de G4. Fazendo uso de um núcleo central de acridina, o grupo de Redman efectuou acoplamentos terminais a diversos péptidos, verificando que compostos com substituição em *meta* e *para* tinham mais tendência para tomar como alvo os G4 do promotor do oncogene *N-ras*, em detrimento de G4 presentes no telómero. Este estudo permitiu assim concluir que, de acordo com o péptido utilizado e posição da substituição, era possível algum grau de discriminação entre os G-quadruplexos-alvo. (73)

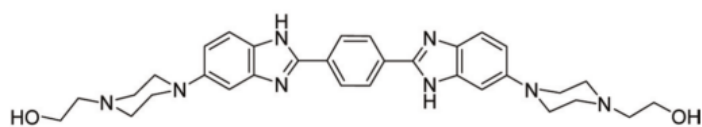
2.3.2. AROMÁTICOS NÃO FUNDIDOS

Além da intercalação entre as tétrades de guanina, os ligandos estabilizadores de G-quadruplexos podem incluir grupos funcionais que visem a interacção com as ansas laterais. Os ligandos não intercalantes podem ou não possuir elementos de ligação às tétrades de guanina, podendo ser por isso menos longos e planares que compostos que almejem a intercalação no G-quadruplexo. Esta classe inclui alguns grupos de ligandos aromáticos não fundidos. (74) Uma vantagem é a maior selectividade G4:ADN duplex geralmente encontrada neste tipo de compostos. (75)

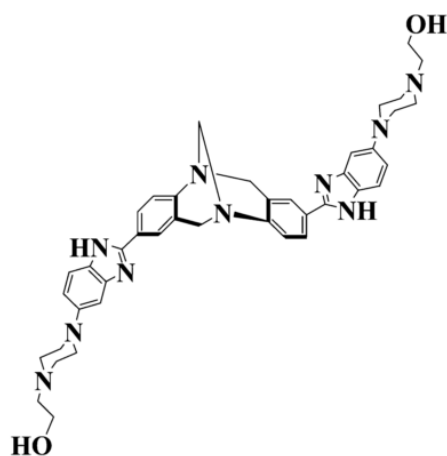
Os bisbenzimidazoles são um tipo muito popular de compostos aromáticos não fundidos, possuindo semelhanças estruturais com as purinas, o que os torna bons candidatos para interacção com regiões ricas em guanina, como os G-quadruplexos. Derivados de bisbenzimidazole podem ser preparados em estrutura angular, formando um “V” (17), sob a forma linear (18) ou acoplados com outros tipos estruturais, como as bases de Tröger (19), de modo a conseguirem conformações que maximizem a estabilização dos G4, como os desenvolvidos por Paul, *et al.* (2012). (74, 76, 77)



17



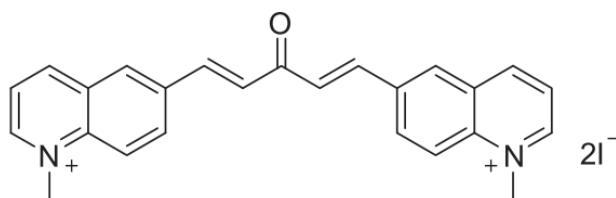
18



19

Figura 11: Derivados de bisdenzimidazole. (74, 76, 77)

Peng, *et al.* (2010) desenvolveram derivados de bisarildicetenos como ligandos não intercalantes de G-quadruplexos, com base em núcleos de bisquinolina, permitindo alguma selectividade entre diferentes tipos de G4. (75)



20

Figura 12: Derivado de bisarildiceteno. (75)

2.3.3. MACROCICLOS

O uso de macrociclos como estabilizadores de G4 popularizou-se graças à telomestatina, um dos ligandos de G4 conhecidos com maior actividade e selectividade para os G-quadruplexos em relação ao ADN duplex. (78) Primeiramente isolada da espécie *Streptomyces annulatus* por Shin-ya, *et al.* (2001), a telomestatina é um ligando macrocíclico neutro, composto por cinco anéis de oxazole, dois de metiloxazole e um de tiazolina, que efectua intercalação com as tétrades de guanina, possuindo um $^{tel}IC_{50}$ de 58 nM e não afectando linhagens celulares normais. (53, 79)

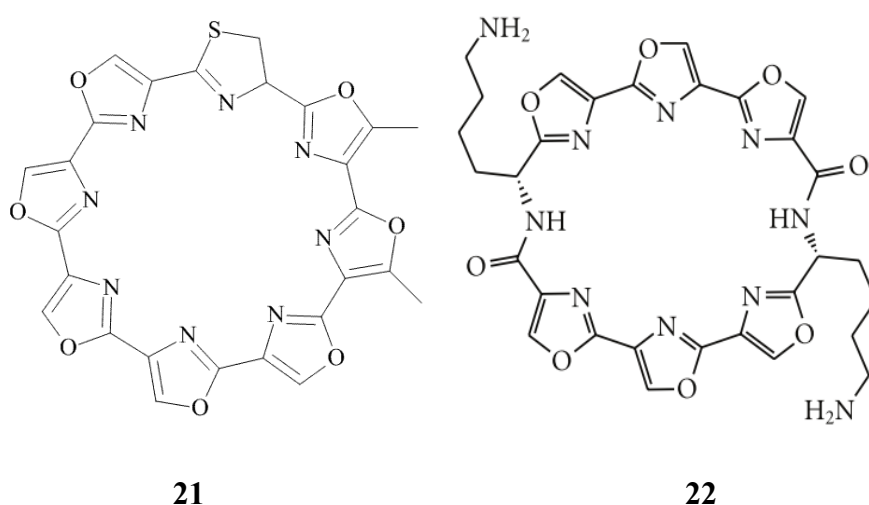


Figura 13: Estruturas da telomestatina e do ligando HXDL. (78)

O facto de a telomestatina ser um ligando difícil de sintetizar implica a inexistência de uma grande classe de compostos baseados na sua estrutura. Contudo, de entre os ligandos baseados na telomestatina que existem, destaca-se o HXDL. Este composto, embora não seja neutro a pH fisiológico como a telomestatina, possui um ΔT_m de 49°C e uma grande selectividade para G4 em detrimento de ADN duplex, característica que pode ainda ser melhorada por dimerização do composto. (78)

Na classe dos ligandos macrocíclicos incluem-se também os derivados de porfirinas, aos quais pertence o ligando TMPyP4. As porfirinas catiónicas são uma família de compostos bastante vasta e muito utilizada em estudos de estabilização de G-quadruplexos, encontrando-se os ligandos frequentemente coordenados com catiões metálicos. (53, 78) Contudo, apesar de apresentar IC_{50} na ordem dos μM para diversas

linhagens celulares neoplásicas, o IC₅₀ do TMPyP4 para linhagens normais é da mesma ordem de grandeza, sendo causador de citotoxicidade. (78)

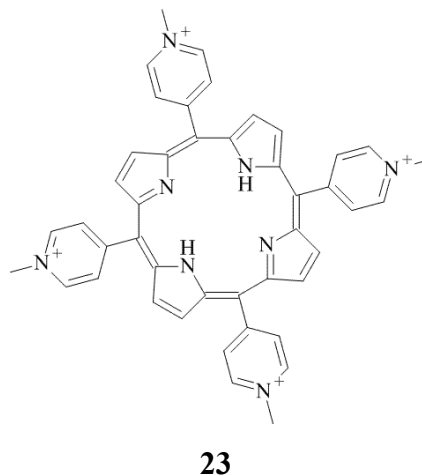


Figura 14: Estrutura do ligando TMPyP4.

Para além destes ligandos, existe ainda uma terceira classe de macrociclos estabilizadores de G4, os ciclofanos de poliamónio. Esta classe divide-se em dois tipos, os ciclobisintercaladores e as plataformas aromáticas de neomicina. Estes compostos são os menos conhecidos de entre os macrociclos para a estabilização de G4, podendo ser constituídos por múltiplos cíclicos de unidades policíclicas aromáticas, que se verifica possuírem melhores interações com os G4 nesta forma ao invés da monomérica, bem como melhores valores de selectividade em relação ao ADN duplex. (78)

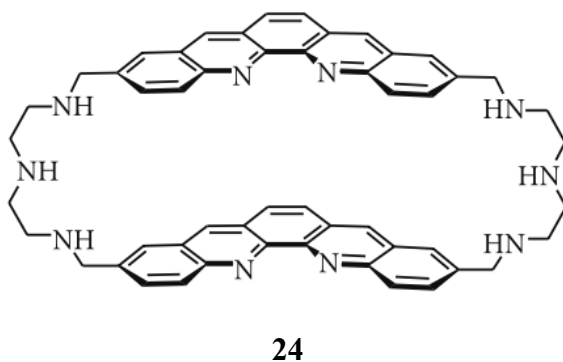


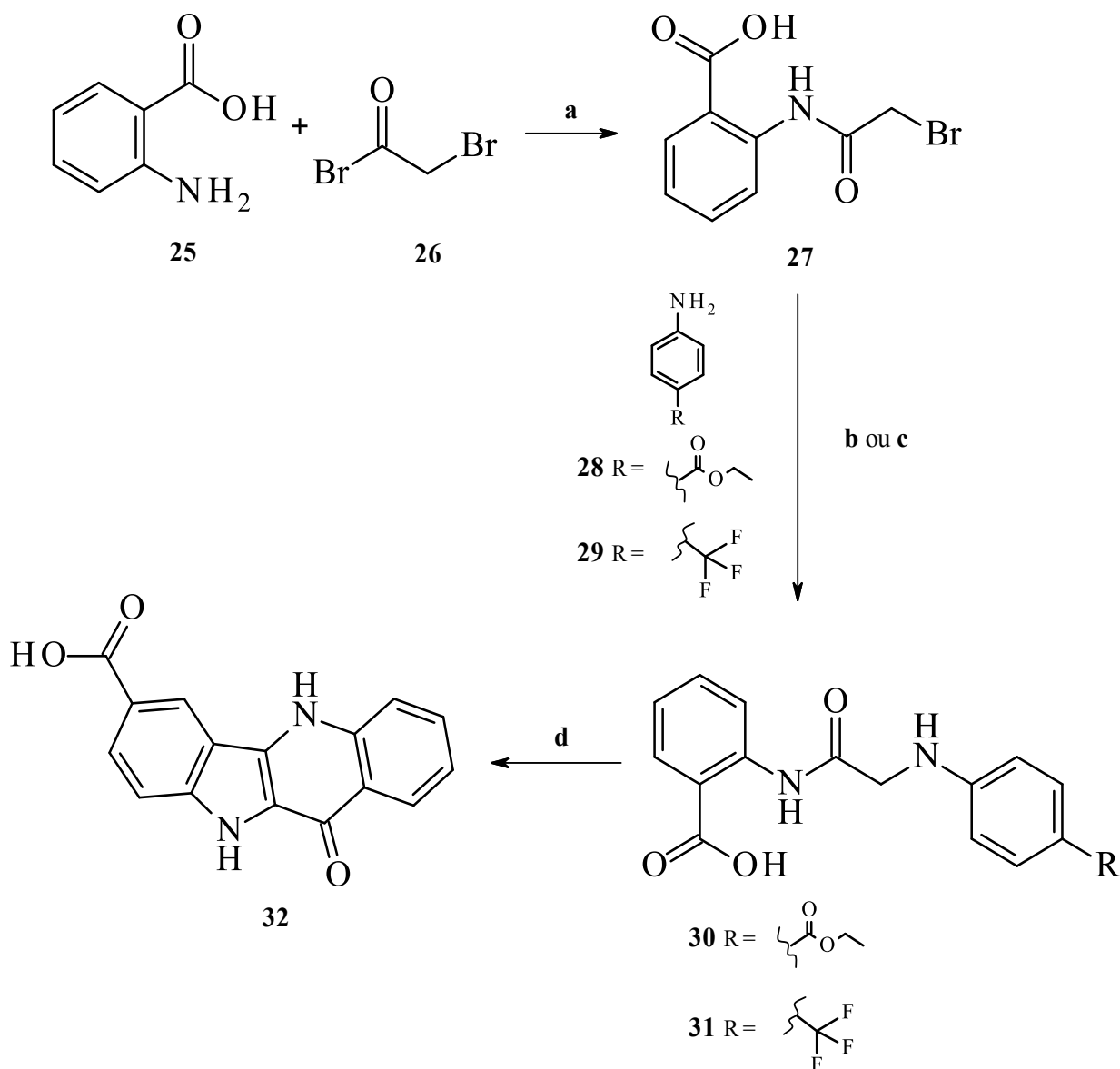
Figura 15: Estrutura do ciclofano de poliamónio BOQ₁. (78)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SÍNTESE DE DERIVADOS TRI-SUBSTITUÍDOS DE INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINAS

3.1.1. SÍNTESE DO ÁCIDO 11-OXO-5,10-DIHIIDROINDOLO[3,2-*B*] QUINOLINA-7-CARBOXÍLICO

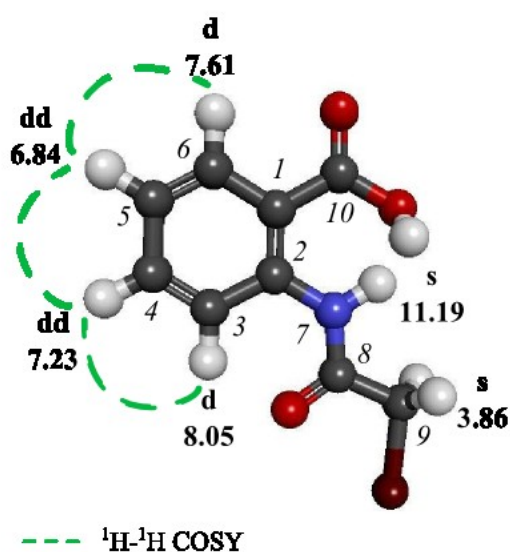
Na síntese dos compostos pretendidos (ver **Objectivos do trabalho**) foi utilizado o método modificado de Görlitzer e Weber, uma vez que provou tratar-se de um método de síntese relativamente simples e de baixo custo. (67, 68) A progressão das reacções foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC).



Esquema 1: Procedimento sintético para a obtenção do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*] quinolina-7-carboxílico (**32**). a) 1,4-dioxano/DMF (1:1), 0°C → rt, overnight; b) DMF, MW (300W), 140°C, 4h; c) ACN, refluxo, 72 h; d) PPA, 130°C, 2h.

O procedimento sintético inicia-se com uma reacção de substituição nucleofílica entre o grupo amina do ácido antranílico (**25**) e o grupo carbonilo do brometo de bromoacetilo (**26**), originando o composto **27** com um rendimento de 99%.

O composto **27** foi caracterizado com recurso a técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) uni- (^1H) e bi-dimensionais (COSY) e espectro de infravermelho (IV), tendo sido também determinado o seu ponto de fusão. Os espectros deste composto podem ser consultados no Anexo I: Espectros de RMN (^1H , COSY) e IV do composto **27**. A **Figura 16** representa resumidamente os desvios químicos e interacções visíveis nos espectros.



O espectro de ^1H RMN do composto **27** apresenta um singuleto a 11,19 ppm, correspondente ao protão da acetanilida (H7). O facto de este protão se encontrar a um desvio químico tão elevado pode dever-se a um efeito anisotrópico paramagnético. O outro singuleto presente no espectro, com um desvio químico de 3,86 ppm e integração para dois protões, corresponde aos protões H9.

Figura 16: Desvios químicos e interacções visíveis nos espectros de ^1H e COSY para o composto **27**.

Cores: Cinzento: C; Branco: H; Vermelho: O; Azul: N; Grená: Br.

As atribuições são obtidas pela comparação com os resultados obtidos por Lavrado (2010) (80), em que foi efectuada a caracterização total deste composto por análise bidimensional. A comparação entre os resultados encontra-se resumida na **Tabela 1**.

Tabela 1: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto **27**.

H	δ (ppm)	
	Lavrado (2010) (80)	Trabalho presente
3	8,06	8,05
4	7,24	7,23
5	6,82	6,84
6	7,62	7,61
7	11,23	11,19
9	3,87	3,86

O passo seguinte consiste numa reacção de substituição nucleofílica entre o grupo amina da benzocaína (**28**) e o carbono α do composto **27**. Esta reacção de formação do composto **30** foi alvo de diversas abordagens, descritas sucintamente na **Tabela 2**.

Tabela 2: Condições reaccionais utilizadas na obtenção do composto **30**.

	Benzocaína (eq.)	Solvente	Base	Condições reaccionais	η (%)
A	1.5	ACN	TEA (1.5 eq.)	Refluxo, 168h	Não reagiu
B	2.5	ACN	TEA (1.5 eq.)	Refluxo, 168h	1
C	1.2	DMF	---	150°C, 72h	Não reagiu
D	3.5	DMF	---	150°C, 144h	38
E	3.5	DMF	---	MW (300 W), 130°C, 3h	24
F	3.5	DMF	---	MW (300 W), 135°C, 3h	38
G	3.5	DMF	---	MW (300 W), 140°C, 3h	59
H	3.5	DMF	---	MW (300 W), 140°C, 4h	62

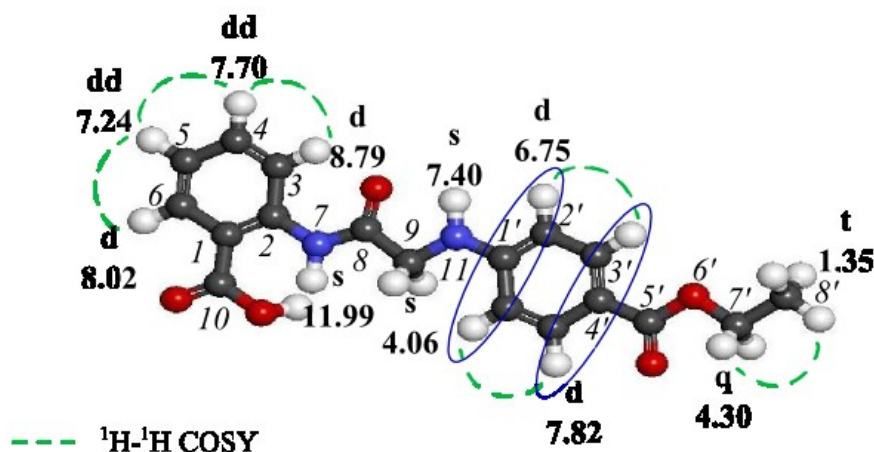
A análise da **Tabela 2** revela que a reacção do composto **27** com a benzocaína (**28**) é favorecida pela presença de excesso de benzocaína, pelo aumento do tempo de reacção e pelo aumento da temperatura reaccional. Talvez por esta razão, o solvente mais adequado demonstra ser a dimetilformamida, em detrimento do acetonitrilo, que possui um ponto de ebulição mais baixo. O uso de uma base forte com o intuito de aumentar a nucleofilia do grupo amina da benzocaína não produziu qualquer efeito nas primeiras tentativas, pelo que o seu uso foi abandonado.

Uma vez que se constatou que para ser obtido um rendimento de 38% eram necessários 6 dias (entrada **D**), foi depois aplicada a técnica de micro-ondas (300 W) a esta reacção. Verificou-se que o rendimento era igualado com aquecimento a 135°C e em apenas 3h de reacção (entrada **F**), o que torna esta técnica mais viável que o convencional método térmico, pela poupança em tempo. De igual modo, demonstrou-se que um aumento da temperatura da reacção até ficar mais próxima do ponto de ebulição do DMF implicava também rendimentos maiores (entradas **E** a **G**).

Verifica-se, assim, que o uso da técnica de micro-ondas em conjugação com a aproximação à temperatura de ebulição do DMF e um ligeiro aumento do tempo reaccional constituem uma abordagem vantajosa à síntese do composto **30** (entrada **H**).

De modo a obter a indoloquinolina **32** (ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*]quinolina-7-carboxílico), foi também tentada a abordagem com recurso à anilina **29** (4-(trifluorometil)anilina) (1.2 eq.), de modo a formar o composto **31**, usando acetonitrilo como solvente e levando-o a refluxo durante 72 horas. No entanto, tendo-se verificado que apenas se conseguiam obter 10 mg de composto impuro, num rendimento máximo de 0.25%, o processo foi considerado inviável. A alternativa, o composto **30**, produz melhores resultados sob as mesmas condições de temperatura e uso do mesmo solvente (entrada **B**), sendo a benzocaína (**28**) também uma amina menos dispendiosa que a *para*-trifluorometilanilina (**29**). É possível verificar, em ambos os casos, a inexistência de rendimentos elevados, que pode ser explicada pelo facto de os substituintes das anilinas serem grupos electroattractores, diminuindo a nucleofilia dos grupos amina em *para*.

Os compostos **30** e **31** foram caracterizados com recurso a ^1H RMN e COSY, tendo o composto **30** sido também analisado por espectroscopia de IV e determinado o seu ponto de fusão. Os desvios químicos de ^1H RMN foram comparados com os existentes na literatura de modo a validar a atribuição. (54, 80)



Cores: Cinzento: C; Branco: H; Vermelho: O; Azul: N.

Figura 17: Desvios químicos e interações visíveis nos espectros de ^1H e COSY para o composto **30**.

O espectro de ^1H do composto **30** contém um singuleto a 11,99 ppm, correspondente ao sinal do protão H7 do grupo amida. Na região alifática, são visíveis um quadruplete (q) a 4,30 ppm e um triplete (t) a 1,35 ppm, integrando para dois e três protões, respectivamente. Estes sinais foram atribuídos aos protões H7' e H8', por esta ordem, podendo a atribuição ser confirmada pela interação entre estes sinais visível no espectro de COSY. Nesta região é também possível observar um duplete a 4,06 ppm, que integra para dois protões, atribuído aos protões H9. O sinal a 7,40 ppm correlaciona-se com os protões H9, pelo que é possível atribuí-lo ao protão H11.

Na região de ressonância dos prótons aromáticos verifica-se a existência de dois sinais que integram para dois prótons cada, a 7,82 ppm e 6,75 ppm. Estes sinais são característicos de um sistema benzénico *para*-substituído e, por isso, podem ser atribuídos aos conjuntos de prótons H2' e H3'. Através do estabelecimento de estruturas de ressonância para o composto **30**, é possível averiguar que H2' sofrem um efeito de blindagem induzido pelo átomo de azoto electrodador, pelo que se atribui a estes prótons o sinal a 6,75 ppm e a H3' o sinal a 7,82 ppm.

Nesta região existem ainda quatro outros sinais, a 8,79, 8,02, 7,70 e 7,24 ppm, integrando para um próton cada, e que correspondem aos prótons H3 a H6. Uma vez que os sinais a 8,79 ppm (d) e 8,02 ppm (d) possuem apenas uma correlação cada no espectro de COSY, é possível atribuir estes sinais aos prótons H6 e H3. O facto de os sinais se apresentarem como dupletos ao invés de duplos dupletos pode ser explicado por as constantes *meta* serem muito pequenas, não se distinguindo os picos menores. Por analogia ao que acontece para o composto **27**, o sinal a 8,79 ppm corresponderá ao próton H3 e o sinal a 8,02 ppm ao próton H6. Os dois restantes sinais apresentam-se sob a forma de duplos dupletos (dd). Tal como se verifica para o composto **27**, o próton H5 fica ligeiramente mais blindado que H4 devido ao efeito de blindagem induzido pelo átomo electrodador de azoto em posição *para*, pelo que se lhe atribui o sinal a 7,24 ppm e o sinal a 7,70 ppm é atribuído ao próton H4. A atribuição é corroborada por comparação com os dados existentes na literatura (**Tabela 3**). (54, 80)

Tabela 3: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto **30**.

H	δ (ppm)	
	Literatura (54, 80)	Trabalho presente
3	8,69	8,79
4	7,56	7,70
5	7,14	7,24
6	8,03	8,02
7	---	11,99
9	4,02	4,06
11	---	7,40
2'	6,68	6,75
3'	7,82	7,82
7'	4,28	4,30
8'	1,35	1,35

No que diz respeito ao composto **31**, a identificação foi feita por ^1H RMN e COSY, constatando-se que o composto se encontrava impuro.

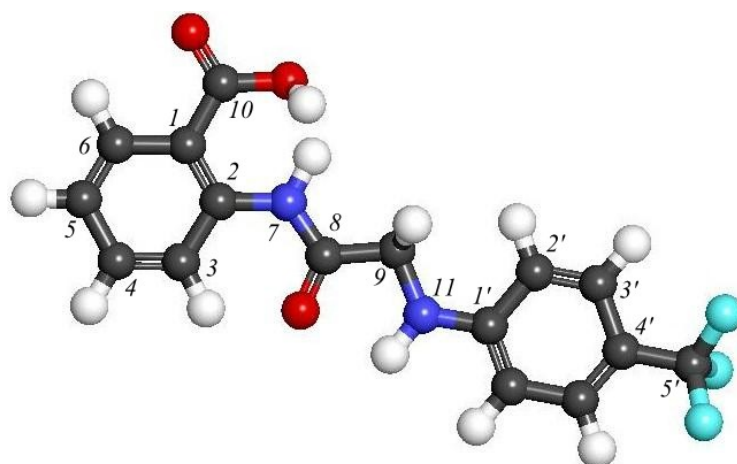


Figura 18: Composto **31** com posições numeradas.

As atribuições dos sinais foram efectuadas de acordo com a literatura existente, segundo com a **Tabela 4**.

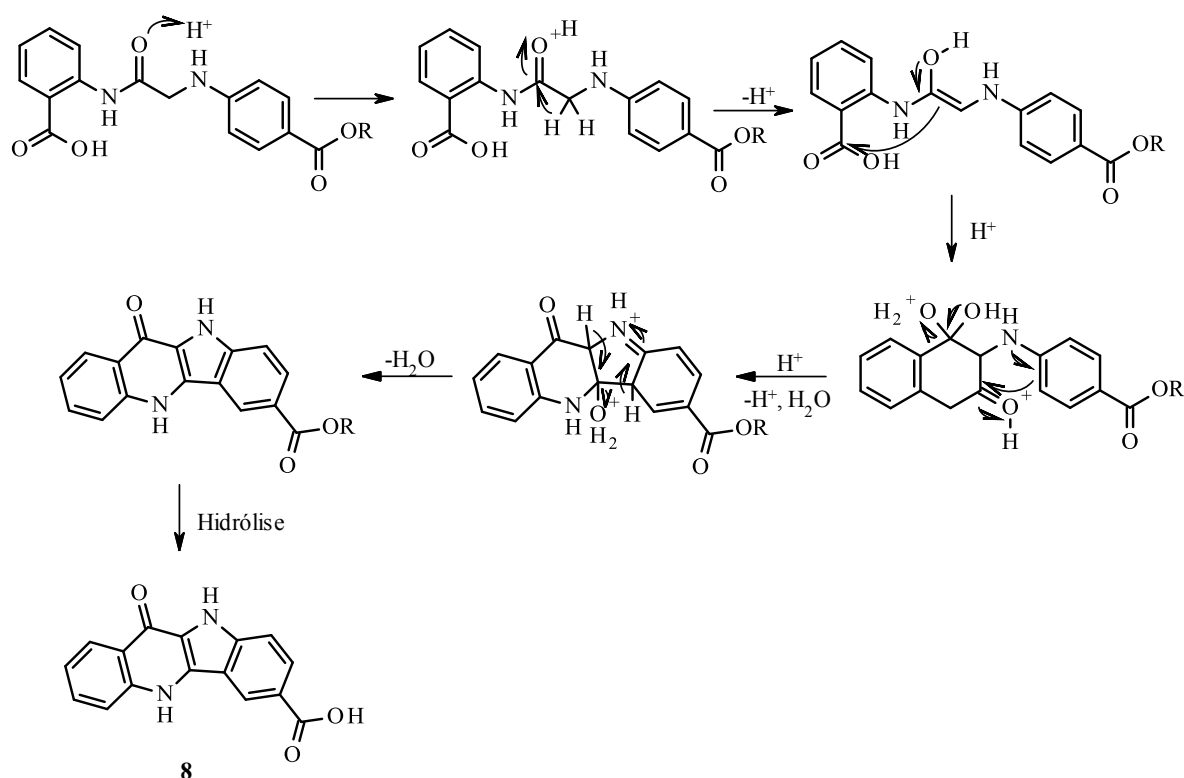
Tabela 4: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto **31**.

H	δ (ppm)	
	Literatura (54, 80)	Trabalho presente
3	8,70	8,70
4	7,61	7,60
5	7,15	7,16
6	7,94	7,95
7	11,94	11,92
9	3,95	3,96
11	---	7,16
2'	6,73	6,73
3'	7,43	7,43

O terceiro passo reaccional consiste numa ciclização do composto **30** catalisada por ácido polifosfórico (PPA). A obtenção do composto **32** a partir do composto **31** poderia ter sido efectuada pelos mesmos meios que a conversão de **30** em **32**, usando ácido polifosfórico (PPA). O efeito electrónico do átomo de azoto adjacente ao anel permitiria a reacção por substituição nucleofílica assistida por grupo vizinho, promovendo a

clivagem da ligação C-F do grupo CF_3 , seguindo-se a hidrólise do intermediário difluorometileno até ser originado o ácido carboxílico correspondente (**32**). (69, 81–83)

O mecanismo da conversão de **30** em **32** foi proposto por Lavrado (2010) (80), encontrando-se representado no **Esquema 2**. Este mecanismo inicia-se com um tautomerismo ceto-enólico, que permite um posterior ataque nucleofílico do carbono α ao carbonilo do ácido carboxílico, formando-se um anel estável de seis membros. Uma vez que o diol presente neste anel é mais instável que um grupo carbonilo, ocorre uma desidratação. Seguidamente, o par de electrões livres do azoto da anilina induz o ataque do carbono *orto* ao carbonilo formado no anel de seis membros, formando deste modo o anel de cinco membros e, conseqüentemente, uma nova estrutura tetracíclica aromática após desidratação.



Esquema 2: Mecanismo de ciclização proposto para obtenção do composto **32** (80).

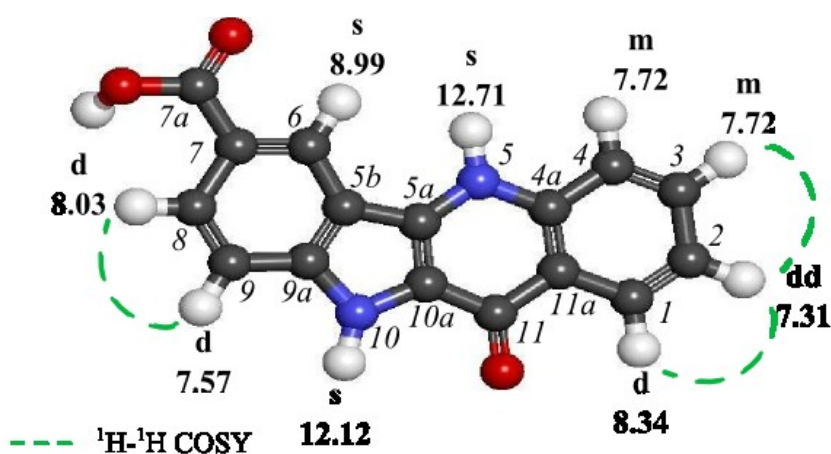
Os rendimentos obtidos para este passo de dupla ciclização foram continuamente baixos, devido a um conjunto de factores. Primeiramente, a presença do grupo carboxilo na molécula pode gerar problemas de polimerização por formação de trioligómeros. (84) Por outro lado, o isolamento do produto é efectuado com recurso a extracções efectuadas com água e AcOEt, sendo que modificações no pH da fase aquosa

mostraram que é obtido mais composto a pH ácido (2-4). Contudo, o composto pode ser obtido com maior pureza a pH neutro, mas em menores quantidades. Técnicas de extracção após concentração da fase aquosa sob vácuo e *salting-out* foram igualmente tentadas de modo a melhorar o rendimento, mas sem sucesso.

O composto **32** foi caracterizado recorrendo a técnicas de RMN uni- (^1H) e bi-dimensional (COSY), bem como espectroscopia de IV, sendo a atribuição confirmada através da análise de literatura (54, 80). Esta comparação encontra-se disponível na **Tabela 5**.

Tabela 5: Comparação entre desvios químicos obtidos para o composto **32**.

H	δ (ppm)	
	Literatura (54, 80)	Trabalho presente
1	8,36	8,34
2	7,32	7,31
3	7,72	7,72
4	7,72	7,72
5	12,80	12,71
6	8,99	8,99
8	8,04	8,03
9	7,56	7,57
10	11,69	12,12



Cores: Cinzento: C; Branco: H; Vermelho: O; Azul: N.

Figura 19: Desvios químicos e interacções visíveis nos espectros de ^1H e COSY para o composto **32**.

O espectro de RMN do composto **32** contém dois sinais a campo baixo, com 12,71 e 12,12 ppm, correspondentes aos prótons dos dois azotos do anel de indolo[3,2-*b*]quinolina (H5 e H10).

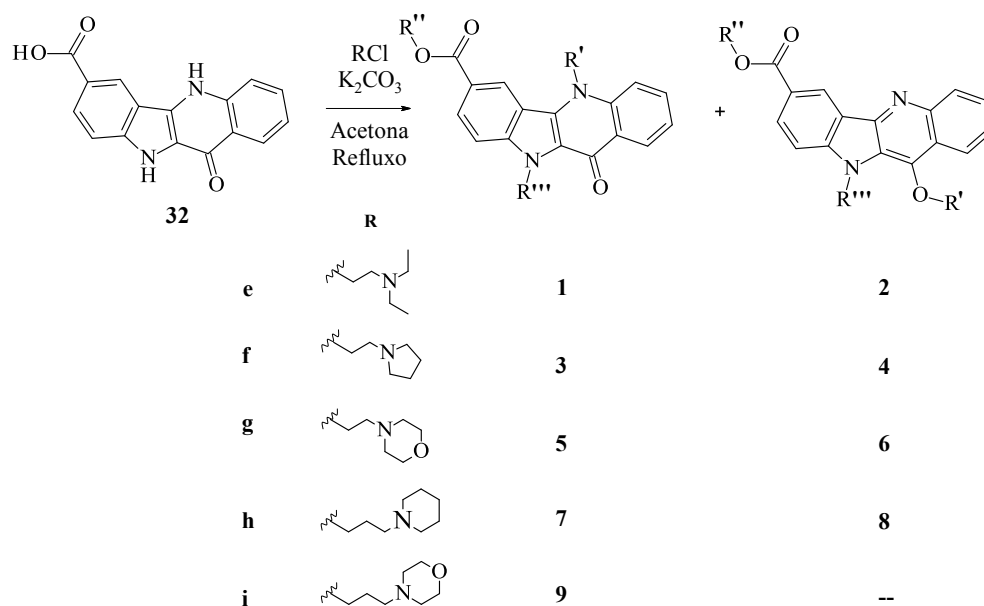
Os restantes sinais do espectro localizam-se entre os 9 e os 7 ppm, correspondendo os seis sinais aos sete prótons aromáticos do composto **32**. Pela análise da **Figura 19**, verifica-se que o singuleto a 8,99 ppm é o único na região dos aromáticos sem correlações fortes no COSY, pelo que este sinal poderá corresponder ao próton H6. Dado existir uma correlação entre o duplete a 8,03 ppm e o duplete a 7,57 ppm, é também possível atribuir estes sinais aos prótons H8 e H9, respectivamente. É de ressaltar que, embora o COSY mostre uma interacção muito fraca entre H6 e H8 (ver Anexo IV: Espectros de RMN (¹H, COSY, ¹³C, HMQC e HMBC) e IV do composto), permitindo a identificação do último, os sinais destes não se desdobram devido à interacção em *meta*, aparecendo como um singuleto e um duplete, respectivamente.

Os outros três sinais correspondem aos prótons aromáticos H1 a H4, localizando-se a 8,34 (d, 1H), 7,72 (m, 2H) e 7,31 ppm (dd, 1H). A observação da **Figura 19** mostra que as interacções neste conjunto de prótons são as do duplete a 8,34 ppm com o duplete de dupletos (mascarado como um tripleto aparente) a 7,31 ppm, e deste com o multiplete a 7,71 ppm, pelo que é possível atribuir o sinal a 8,36 ppm ao próton H1, o sinal a 7,32 ppm ao próton H2 e o sinal a 7,71 ppm aos prótons H3 e H4, atribuição confirmada pela comparação com a literatura na **Tabela 5**.

3.1.2. ALQUILAÇÃO DO ÁCIDO 11-OXO-5,10-DIHIIDROINDOLO[3,2-*B*] QUINOLINA-7-CARBOXÍLICO

Os derivados tri-alquilados do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*] quinolina-7-carboxílico (**1-9**) foram obtidos por reacção deste (**32**) com as correspondentes cloroalquilaminas, conforme representado no **Esquema 3**.

As reacções de substituição nucleofílica com as cloroalquilaminas apropriadas foram efectuadas em acetona, sob refluxo e na presença de uma base (K₂CO₃), de modo a facilitar a reacção de substituição nucleofílica, com controlo da reacção por TLC. Estas reacções dão origem à formação de dois produtos tri-substituídos, um com inserção das cadeias em N5, N10 e passando o ácido carboxílico a éster (N,N,COOR), e outro em que a inserção se dá em O11 em vez de N5 (N,O,COOR). O isolamento dos produtos foi efectuado por PTLC, sendo os produtos a isolar os maioritários, determinados por TLC. Para estas reacções, é igualmente possível a formação de derivados di-substituídos, não tendo contudo sido isolado e analisado nenhum dos produtos minoritários presentes nas PTLC. A **Tabela 6** mostra as condições específicas de cada uma das reacções, bem como os rendimentos para cada um dos produtos isolados.



Esquema 3: Derivados tri-alkilamina do ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*]quinolina-7-carboxílico (**1** a **9**).

Tabela 6: Condições reaccionais utilizadas na obtenção dos produtos **1** a **9** e rendimentos relativos a cada um dos produtos isolados.

	RCl (eq.)	K ₂ CO ₃ (eq.)	Condições reaccionais	η (%)
e	6	15	Acetona, refluxo, 24h	1: 14 2: 13
f	6	15	Acetona, refluxo, 24h	3: 6 4: 4
g	6	15	Acetona, refluxo, 24h	5: 5 6: 11
h	6	15	Acetona, refluxo, 46h	7: 22 8: 11
i	6	15	Acetona, refluxo, 22h	9: 2

A análise da **Tabela 6** permite averiguar que os compostos N,N-substituídos (**1**, **3**, **7**) possuem rendimentos ligeiramente superiores quando comparados com os compostos N,O-substituídos (**2**, **4**, **8**) nas reacções em que foi possível o isolamento de ambos, o que vai parcialmente contra alguns resultados obtidos para compostos semelhantes (54, 80). Este padrão está provavelmente associado a uma perda significativa de composto no isolamento. Houve igualmente alguma dificuldade na determinação do término da reacção, dada a dificuldade em determinar por TLC se ainda existia reagente inicial (**32**) presente no meio reaccional, devido à sua tendência para permanecer na fase aquosa nas micro-extracções efectuadas para o efeito, mesmo na presença de variações de pH. Um outro factor a considerar será a força dos electrófilos utilizados. O aumento da cadeia

alifática onde se dá a substituição traduz-se numa diminuição da sua reactividade por S_N2 por efeito indutivo, pelo que seria de esperar uma diferença nos rendimentos obtidos entre as cadeias etilamina e propilamina, o que não aconteceu. Este facto poderá também estar relacionado com os diferentes valores de pK_a dos átomos de azoto dos grupos terminais e outros factores associados à técnica de isolamento.

Os compostos **1** a **9** foram caracterizados com recurso a técnicas de RMN uni- (1H e ^{13}C) e bi-dimensionais (COSY, HMQC e HMBC). A técnica de HMBC foi utilizada apenas para os compostos **1** e **2**, sendo as restantes atribuições efectuadas por comparação com compostos semelhantes anteriormente sintetizados (**Figura 20**). (54, 80) Para além das técnicas de RMN, foram efectuados espectros de IV destes compostos e determinados os seus pontos de fusão.

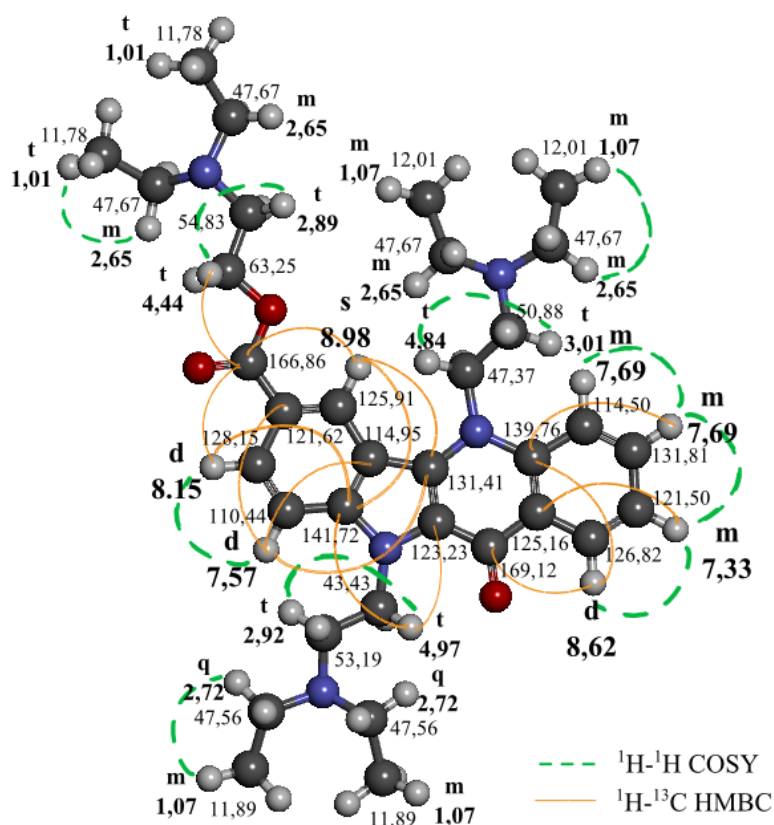


Figura 20: Resumo dos desvios químicos e interações para o composto **1**.

À semelhança do que acontece para o composto **19**, os espectros do Anexo V: Espectros de RMN (1H , COSY, ^{13}C , HMQC, HMBC) e IV do composto mostram a presença de seis sinais referentes a prótons aromáticos para o composto **1**. De entre estes, é identificável a presença de um singuleto a 8,98 ppm, integrando para um próton, que só pode corresponder ao portão H6. Este sinal possui, no espectro de COSY, uma

correlação fraca (*meta*) com o próton H8, que se encontra representado por um duplete a 8,15 ppm, e que, por sua vez, possui uma correlação forte com o próton H9 (d, 7,57 ppm, $J = 9,0$ HzHzHHH). De igual modo, os restantes sinais, a 8,62 (d, 1H), 7,69 (d, 2H) e 7,33 ppm (m, 1H) correspondem, respectivamente, aos prótons H1 a H4.

De modo a proceder a uma caracterização completa do composto **1**, foram efectuados também os espectros de ^{13}C -APT e HMQC do mesmo. O espectro de ^{13}C -APT mostra apenas 7 sinais referentes a prótons CH entre os 105 e os 135 ppm, correspondendo estes aos carbonos terciários do anel aromático. Assim, pela análise do espectro de HMQC, combinado com as conclusões anteriores referentes à análise do espectro de COSY, é possível atribuir directamente o sinal a 125,91 ppm ao C6, o sinal a 126,82 ppm ao C2, o sinal a 128,15 ppm ao C8, o sinal a 110,44 ppm ao C9 e o sinal a 121,50 ppm ao C1. Uma vez que o sinal a 166,86 ppm possui correlações com o singuleto a 8,98 ppm (H6), bem como uma correlação mais fraca com o duplete a 8,15 ppm (H8), e ainda uma outra correlação com o sinal a 4,44 ppm, pode ser feita a atribuição deste sinal ao carbono C7a. A existência de uma correlação forte com o sinal de ^1H a 4,44 ppm (t) sugere que este sinal pertença aos prótons H1''. Por seu lado, o sinal a 169,12 ppm possui apenas uma correlação no espectro de HMBC com o duplete a 8,62 ppm (H1), poderá ser atribuído ao carbono C11.

Uma vez que os sinais dos prótons H3 e H4 se encontram sobrepostos no espectro de ^1H RMN, não é possível identificar os respectivos carbonos recorrendo apenas ao espectro de HMQC, uma vez que a este sinal de ^1H RMN correspondem dois sinais de ^{13}C , um a 131,81 ppm e o outro a 114,50 ppm. Deste modo, é necessário analisar as interacções correspondentes no espectro de HMBC para realizar a atribuição. O sinal a 114,50 ppm possui uma interacção com o multiplete a 7,33 ppm (H2) e, por seu turno, o sinal a 131,81 ppm correlaciona-se com o duplete a 8,62 ppm (H1). Assim, é possível atribuir o sinal a 114,50 ppm ao carbono C4 e o sinal a 131,81 ppm ao carbono C3.

No que diz respeito aos restantes sete sinais de C_{quat} , é possível constatar que o sinal a 141,72 ppm se correlaciona fortemente com os sinais a 8,98 ppm (H6) e 8,15 ppm (H8), sugerindo que o núcleo de carbono diste de três ligações de cada um destes prótons. Deste modo, este sinal pode ser atribuído a C9a. Este sinal possui também uma correlação com o sinal de ^1H a 4,97 ppm (t, 2H), o que permite a atribuição deste sinal aos prótons H1'''.

A única correlação existente para o sinal de ^{13}C a 123,23 ppm dá-se com o triplete a 4,97 ppm integrando para dois prótons (H1'''), pelo que se pode fazer a atribuição do sinal a 123,23 ppm ao carbono C10a. A atribuição do sinal restante, a 121,62 ppm, ao carbono C7, é confirmada pela sua correlação forte com H9.

Como discutido acima, e de acordo com o espectro de HMBC, o sinal a 4,97 ppm deverá resultar da ressonância dos prótons H1''' e o sinal a 4,44 ppm aos prótons H1''. O outro triplete, localizado a 4,84 ppm, corresponderá portanto aos prótons adjacentes a

N5, ou seja, aos prótons 1'. No espectro de COSY, o sinal a 4,97 ppm (H1''') correlaciona-se com o sinal a 2,92 ppm, correspondendo este sinal portanto aos prótons H2'''. Por outro lado, o sinal a 4,84 ppm (H1') possui uma correlação com o sinal a 3,01 ppm, que corresponderá a H2'. O sinal a 4,44 ppm (H1''), por seu turno, correlaciona-se com o sinal a 2,89 ppm, pelo que este deverá corresponder a H2''.

Os sinais a 2,92 e 2,89 ppm são dois tripletos que aparecem com alguma sobreposição, distorcendo o seu aspecto. O restante sinal, a 3,01 ppm, é também ele um triplete, sendo que todos integram para dois prótons. O aspecto destes sinais está, após resolvida a sobreposição, de acordo com o previsível, dado que cada conjunto de prótons se correlaciona com dois prótons equivalentes. Pelo espectro de COSY, verifica-se igualmente a inexistência de outras correlações por parte dos sinais a 3,01, 2,92 e 2,89 ppm, condicente com a atribuição efectuada.

Existem ainda dois outros sinais, um quadrupeto a 2,72 ppm, que integra para quatro prótons, e um multipeto a 2,65 ppm, integrando para 8 prótons, que pode resultar da sobreposição de outros dois quadrupletos. Estes sinais deverão, pois, corresponder à ressonância dos prótons 3', 3'' e 3'''. A multiplicidade destes sinais deve-se à interacção dos conjuntos de dois prótons com três prótons equivalentes (série 4') cada, presentes a três ligações de distância. Do mesmo modo, os sinais devidos à ressonância dos prótons 4', 4'' e 4''' deverão aparecer no espectro como tripletos. De facto, verifica-se a existência de um triplete integrando para seis prótons a 1,01 ppm e, aparentemente, de um quarteto a 1,07 ppm. No entanto, a existência de um quarteto nesta região e com integração para doze prótons não se coaduna com a estrutura do composto **1**, pelo que se conclui que este sinal poderá resultar, na realidade, da sobreposição de dois tripletos com integração para seis prótons cada.

No espectro de ^{13}C , a cerca de 12 ppm, são visíveis três sinais negativos, correspondentes aos seis carbonos CH_3 das cadeias laterais, por sobreposição. A análise do espectro de HMQC permite distinguir correlações entre o sinal de ^{13}C situado a 43,43 ppm e o sinal de ^1H a 4,97 ppm, podendo ser, portanto, atribuído a C1'''. Do mesmo modo, as restantes atribuições dos carbonos das cadeias podem ser efectuadas com recurso ao espectro de HMQC.

No que diz respeito às cadeias terminais N,N-dietilo, os espectros de COSY, HMQC e HMBC não são suficientes para esclarecer a atribuição exacta dos sinais de ^1H e ^{13}C , pelo que qualquer atribuição que se faça é inexata e permutável com as restantes com a mesma numeração.

O procedimento de atribuição dos sinais de RMN foi efectuado analogamente para os restantes compostos finais, encontrando-se os resultados resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Atribuição dos desvios químicos (em ppm) de ^1H e ^{13}C para os compostos **1** a **9**.

	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	8,62	126,82	8,37	121,50	8,65	126,98	8,32	121,40	8,63	126,91	8,33	121,32	8,64	126,81	8,30	121,50	8,66	---
2	7,33	121,50	7,57	125,18	7,37	121,69	7,57	125,29	7,36	121,68	7,58	125,38	7,35	121,47	7,56	125,14	7,39	---
3	7,69	131,81	7,68	127,28	7,74	132,07	7,69	127,34	7,71	132,05	7,70	127,46	7,71	131,70	7,68	127,24	7,73	---
4	7,69	114,44	8,31	129,56	7,74	114,44	8,32	129,62	7,71	114,31	8,33	129,69	7,92	114,84	8,32	129,57	7,89	---
4a	---	139,76	---	146,40	---	139,82	---	146,46	---	139,76	---	146,52	---	139,96	---	146,41	---	---
5a	---	131,41	---	148,23	---	131,57	---	148,24	---	131,40	---	148,27	---	131,46	---	148,33	---	---
5b	---	114,95	---	121,94	---	115,06	---	122,13	---	115,07	---	122,16	---	114,91	---	121,98	---	---
6	8,98	125,91	9,22	124,49	9,04	126,02	9,23	124,53	9,00	126,06	9,21	124,53	8,85	125,85	9,21	124,32	8,91	---
7	---	121,62	---	122,27	---	121,87	---	122,29	---	121,77	---	122,37	---	121,52	---	122,04	---	---
7a	---	166,86	---	166,94	---	166,88	---	166,90	---	166,66	---	166,82	---	167,05	---	167,11	---	---
8	8,16	128,15	8,33	131,25	8,20	128,45	8,32	131,46	8,15	128,01	8,33	131,35	8,14	127,81	8,32	131,19	8,15	---
9	7,57	110,44	7,49	109,05	7,63	110,39	7,52	108,91	7,53	110,33	7,48	109,04	7,67	110,72	7,56	109,18	7,67	---
9a	---	141,72	---	147,47	---	141,67	---	147,26	---	141,66	---	147,52	---	141,83	---	147,47	---	---
10a	---	123,23	---	125,40	---	123,25	---	125,31	---	123,24	---	125,51	---	123,44	---	125,30	---	---
11	---	169,12	---	145,26	---	169,27	---	145,21	---	169,25	---	145,21	---	169,23	---	145,30	---	---
11a	---	125,16	---	122,47	---	125,35	---	122,48	---	125,26	---	122,42	---	125,29	---	122,63	---	---
1'	4,84	47,37	4,29	74,89	4,93	47,56	4,38	75,12	4,89	46,42	4,36	73,20	4,85	45,91	4,28	74,58	4,92	---
2'	3,01	50,88	3,05	53,07	3,15	53,23	3,10	55,90	3,01	55,87	2,92	58,66	2,26	25,96	2,23	27,65	2,28	---
3'	2,65 ^{a)}	47,67 ^{e)}	2,67 ^{e)}	47,75 ^{g)}	2,74 ⁱ⁾	54,50 ^{k)}	2,67 ^{m)}	54,82 ^{o)}	2,69 ^{q)}	54,03 ^{s)}	2,60 ^{v)}	54,31 ^{x)}	2,56	55,57	2,67	55,37	2,52 ^{e)}	---
4'	1,07 ^{b)}	12,01 ^{d)}	1,10 ^{f)}	11,93 ^{h)}	1,82 ^{j)}	23,74 ^{l)}	1,83 ⁿ⁾	23,74 ^{p)}	3,79 ^{r)}	67,05 ^{t)}	3,74 ^{w)}	67,05 ^{y)}	2,44	54,79 ^{z)}	2,53	25,94	1,69	---
5'	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,61	26,20 ^{a)}	1,63	74,58	3,75	---
6'	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,45	24,49	1,54	24,59 ^{d)}	---	---
1''	4,44	63,25	4,47	62,97	4,52	64,22	4,53	64,06	4,51	62,40	4,52	62,27	4,42	63,77	4,42	63,69	4,46	---
2''	2,89	51,23	2,94	51,23	2,92	54,85	2,95	54,63	2,82	58,53 ^{u)}	2,84	57,42	2,04	26,65	2,05	26,50 ^{e)}	2,04	---
3''	2,65 ^{a)}	47,86 ^{c)}	2,55 ^{e)}	47,66 ^{g)}	2,65 ⁱ⁾	54,78 ^{k)}	2,67 ^{m)}	54,78 ^{o)}	2,58 ^{q)}	54,07 ^{s)}	2,46 ^{v)}	54,04 ^{x)}	2,51	56,14	2,55 ^{e)}	56,14	2,52 ^{e)}	---
4''	1,01 ^{b)}	11,78 ^{d)}	0,91 ^{f)}	12,01 ^{h)}	1,82 ^{j)}	23,70 ^{l)}	1,83 ⁿ⁾	23,71 ^{p)}	3,73 ^{r)}	67,05 ^{t)}	3,54 ^{w)}	67,05 ^{y)}	2,37	55,79 ^{b)}	2,53	26,02	1,69	---
5''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,61	26,03 ^{a)}	1,63	74,58	3,75	---

	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
6''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,45	24,57	1,54	24,51 ^{d')}	---	---
1'''	4,97	43,43	4,70	43,99	5,09	44,15	4,80	44,42	5,01	42,63	4,78	42,93	4,96	43,20	4,63	43,11	5,01	---
2'''	2,92	53,19	2,80	52,06	3,02	56,13	2,89	54,89	2,82	57,36 ^{u)}	2,75	57,33	2,15	28,11	2,05	27,05 ^{e')}	2,18	---
3'''	2,72 ^{a)}	47,56 ^{c)}	2,67 ^{e)}	47,66 ^{g)}	2,82 ⁱ⁾	54,80 ^{k)}	2,61 ^{m)}	54,63 ^{o)}	2,58 ^{q)}	54,03 ^{s)}	2,60 ^{v)}	54,04 ^{x)}	2,37	54,52 ^{b, y)}	2,23 ^{e')}	55,96	3,75 ^{e)}	---
4'''	1,07 ^{b)}	11,89 ^{d)}	1,10 ^{f)}	12,12 ^{h)}	1,92 ^{j)}	23,89 ^{l)}	1,78 ⁿ⁾	23,68 ^{p)}	3,64 ^{r)}	67,01 ^{u)}	3,74 ^{w)}	67,10 ^{y)}	2,44	54,82 ^{z)}	2,53	74,58	1,69	---
5'''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,61	25,96 ^{a')}	1,63	26,15	3,75	---
6'''	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,45	24,49	1,54	24,46 ^{d')}	---	---

Legenda: --- Posição não se aplica ao composto em questão. Sinais de ¹H e ¹³C em ppm. Os sinais assinalados como **a) – e')** possuem atribuições tentativas, podendo os valores dos desvios químicos ser permutáveis entre si dentro dos campos assinalados com uma mesma letra.

3.2. RELAÇÃO ESTRUTURA-ESTABILIZAÇÃO DE G-QUADRUPLÉXOS DE ADN

A capacidade de estabilizar G-quadruplexos de ADN pelos compostos sintetizados **1-4** e **6-8** foi efectuada pela determinação do diferencial do ponto de fusão (ΔT_m) de sequências de ADN ricas em guaninas presentes nas regiões promotoras de oncogenes (*K-RAS*), chaperoninas de oncogenes (HSP90) e presentes no telómero (F21T) em relação às mesmas sequências na ausência dos compostos estabilizadores. Foi usada uma sequência complementar de ADN que se rearranja numa estrutura de dupla hélice (Tloop) como controlo para a selectividade da estabilização. Os compostos **1-4** e **6-8** foram utilizados sob a forma de sais, com a fórmula geral R.3(HCl), sendo R a estrutura do derivado de indoloquinolina em questão. Utilizando a técnica de Transferência de Energia de Ressonância de Förster (FRET), procederam-se a ensaios de desnaturação térmica. O trabalho foi realizado pelo Dr. João Lavrado nas instalações da School of Pharmacy, University College London.

Primeiramente, cada um dos compostos foi testado nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 μM para cada um dos alvos, tendo sido determinadas curvas da temperatura de fusão em função da concentração para cada uma das estruturas definidas. Estes perfis da temperatura de fusão dos compostos em função da sua concentração encontram-se representados na **Figura 21**.

A observação da **Figura 21** permite concluir que, para todos os ligandos estudados, a estabilização do G-quadruplexo correspondente ao promotor do gene codificante para a chaperonina HSP90 é ligeiramente superior às dos restantes dois tipos de G-quadruplexos, chegando a registar um ΔT_m de aproximadamente 30°C (gráfico **F**). Em geral, verifica-se uma maior estabilização dos G4 a concentrações de ligando até cerca de 2,5 μM .

Deste modo, foram determinados os intervalos de temperaturas de fusão para os compostos **1-4** e **6-8** à concentração de 2 μM . Os resultados destes ensaios encontram-se representados na **Tabela 8**. Os resultados para a concentração de 1 μM podem ser encontrados no

A **Tabela 8** mostra que, para os três tipos de G-quadruplexos usados neste estudo, o composto **7**, um composto N,N,COO-substituído com um espaçador de três carbonos e um anel de piperidina terminal, é o que induz uma maior estabilização, seguido pelo composto **8** (N,O,COO-substituído, com o mesmo espaçador e anel terminal), que é o segundo melhor a estabilizar os três G-quadruplexos. De entre os compostos com espaçador etilamina, o composto **3** (N,N,COO-substituído, com anel terminal de pirrolidina), mostra ser o melhor a estabilizar os G4. O composto que demonstra induzir uma estabilização mais fraca em todos os casos é o composto **6**, que possui substituição N,O,COO, um espaçador de dois carbonos e um anel terminal de morfolina.

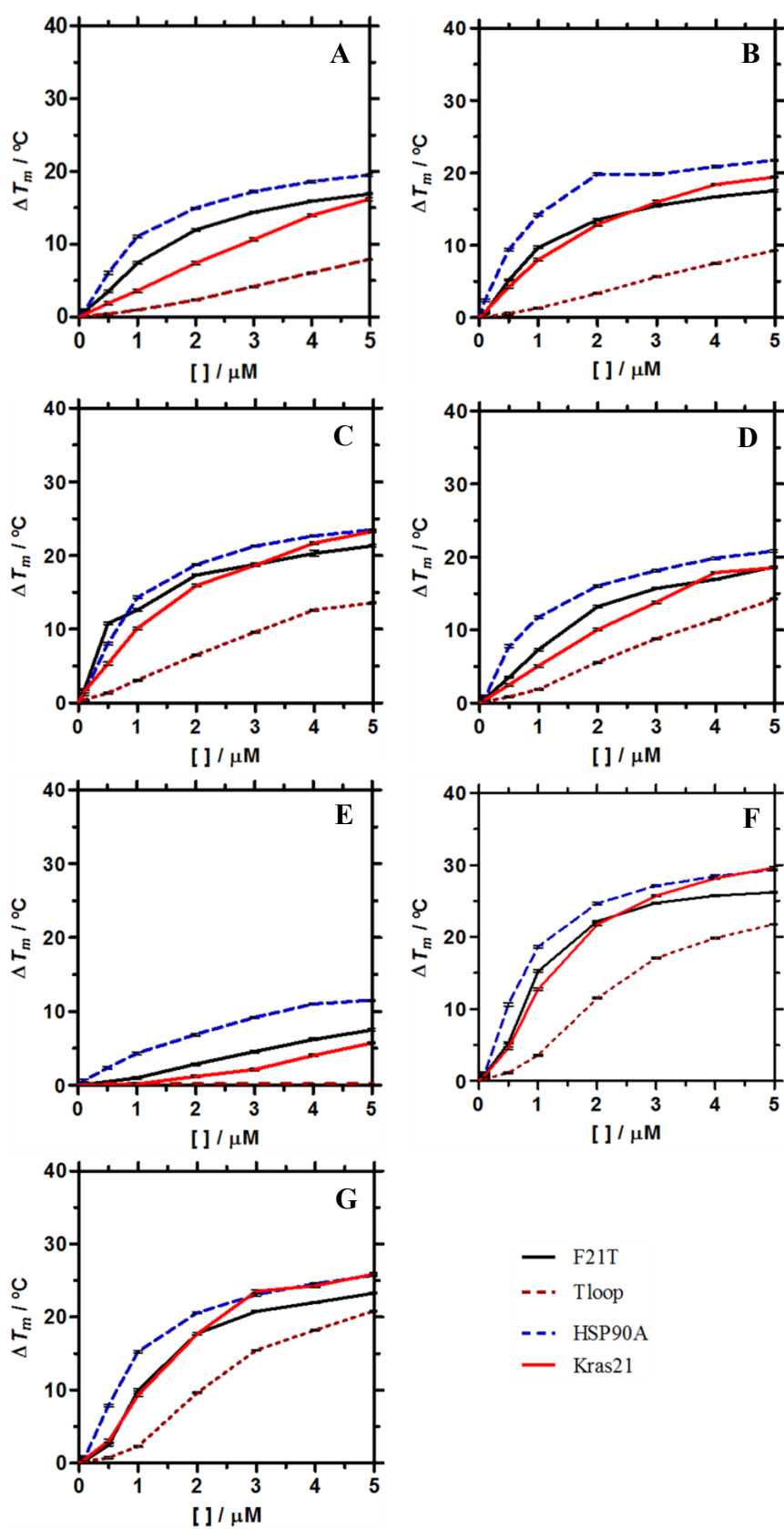


Figura 21: Perfis de desnaturação para os sais dos compostos **1** (A), **2** (B), **3** (C), **4** (D), **6** (E), **7** (F) e **8** (G), para as concentrações de 0.5, 1, 2, 3, 4 e 5 μM .

Tabela 8: Diferencial nas temperaturas de fusão dos diferentes G-quadruplexos e da cadeia de ADN duplex para os compostos **1-4** e **6-8** à concentração de 2 μM .

Composto	Tipo	R	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)				Selectividade
			F21T	HSP90A	KRas21	T-loop	
1	N,N,COOR		12,0	15,0	7,4	2,3	5,2 : 6,5 : 3,2 : 1,0
2	N,O,COOR		13,5	19,8	12,0	3,4	4,0 : 5,8 : 3,5 : 1,0
3	N,N,COOR		17,4	18,8	16,0	6,5	2,7 : 2,9 : 2,5 : 1,0
4	N,O,COOR		13,2	16,1	10,0	5,6	2,4 : 2,9 : 1,8 : 1,0
6	N,O,COOR		2,9	6,9	1,2	0,0	---
7	N,N,COOR		22,9	24,5	21,7	11,5	2,0 : 2,1 : 1,9 : 1,0
8	N,O,COOR		17,8	20,6	17,7	9,6	1,9 : 2,1 : 1,8 : 1,0
			$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	

Uma vez que, teoricamente, a protonação dos átomos de azoto dos grupos R das cadeias laterais favorece a actividade dos compostos, utilizou-se o *software online* SPARC (v. 4.6) (85) para calcular os pK_a dos grupos azotados das cadeias terminais. Estes resultados encontram-se descritos na **Tabela 9**, com o auxílio da **Figura 22**.

Tabela 9: pK_a teórico dos grupos azotados da molécula, obtido pelo programa SPARC (v. 4.6) (85).

Composto	Tipo	R	pK_a		
			N'	N''	N'''
1	N,N,COOR		8,40	8,69	8,54
2	N,O,COOR		7,12	8,70	8,40
3	N,N,COOR		8,24	8,75	8,24
4	N,O,COOR		7,16	8,72	8,20
6	N,O,COOR		4,47	6,04	5,52
7	N,N,COOR		8,17	9,21	8,87
8	N,O,COOR		8,16	9,21	8,91

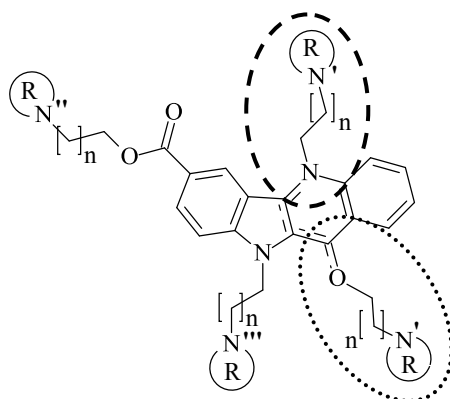


Figura 22: Esquemática das posições N', N'' e N''' para compostos N,N, COOR- e N,O,COOR-substituídos.

Legenda: - - - - N' para compostos N,N,COOR; N' para compostos N,O, COOR.

Os resultados descritos na **Tabela 9** vão de encontro aos resultados experimentais de ΔT_m obtidos para os compostos **1-4** e **6-8** (**Tabela 8**). A maioria dos compostos substituídos em N,O,COO (**2**, **4** e **6**) possuem um pK_a calculado para N' próximo ou inferior a 7, pelo que essa posição estará pelo menos parcialmente desprotonada a pH fisiológico. O efeito intensifica-se com o composto que possui substituintes com anel morfolina (**6**), para o qual se verifica que uma grande fracção de composto terá, a pH 7,4, as três cadeias alquilamina desprotonadas, perdendo-se assim qualquer possibilidade de ligação de hidrogénio com os nucleótidos. De um modo geral, verifica-se que os compostos N,N,COO (**1** e **3**) têm maiores valores de pK_a para N', o que indica uma maior probabilidade de as cadeias estarem protonadas a pH fisiológico, e sejam consequentemente melhores estabilizadores de G4. Esta relação entre a protonação dos grupos azotados das cadeias terminais pode ser observada mais claramente por comparação directa com os resultados experimentais de ΔT_m para cada um dos três tipos de G-quadruplexos, como demonstrado no **Gráfico 1** para *HSP90A*, o G4 para o qual foram obtidas as melhores correlações. A restante informação pode ser consultada no Anexo XIV: Resultados de ΔTM obtidos à concentração de 1 μM para os compostos **1-4** e **6-8**.

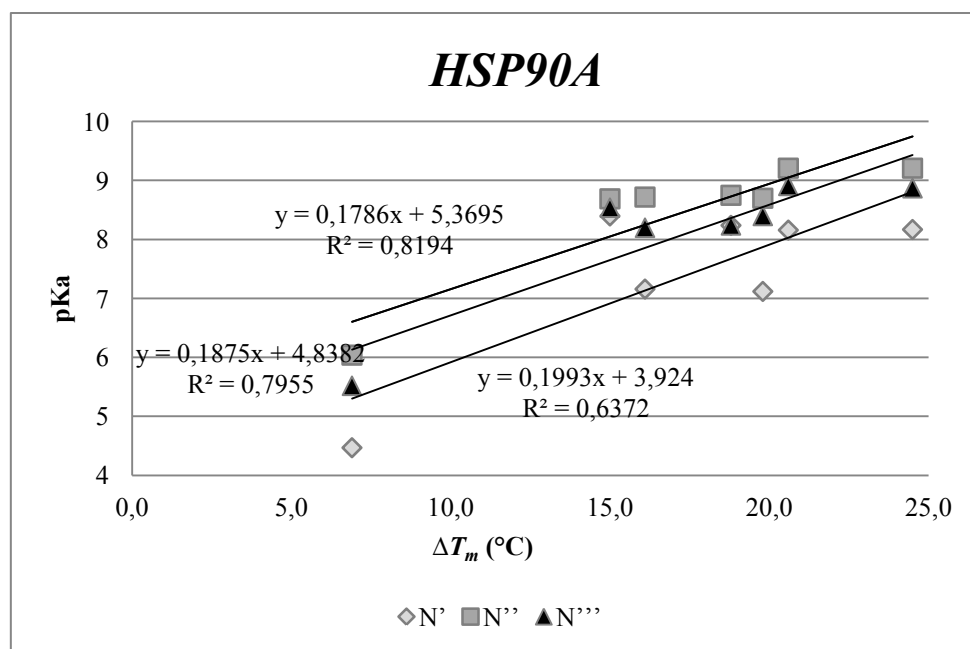


Gráfico 1: Correlação entre pK_a e ΔT_m para cada cadeia azotada terminal, para o G4 da região promotora da chaperonina de oncogenes *HSP90A*.

A partir dos ensaios efectuados, é visível uma tendência na relação estrutura-actividade desta série de compostos, explicitada na **Figura 23**. Assim, tem-se que compostos possuindo um espaçador de três carbonos (cadeia propilamina) tendem a induzir uma maior estabilização dos G-quadruplexos do que aqueles possuindo um espaçador de dois carbonos (cadeia etilamina). De igual modo, a substituição N,N,COO parece ser mais favorável em relação à substituição N,O,COO. Analisando apenas os compostos que possuem um espaçador etilamino, é ainda possível apurar que o grupo terminal pirrolidina produz um efeito de estabilização maior que um grupo N,N-dietil e este, por seu turno, se superioriza em relação ao anel de morfolina. Estes resultados, apoiados pelas observações teóricas do pK_a de cada um dos grupos amina correspondentes, permitem igualmente concluir que a protonação dos átomos de azoto destes grupos a pH fisiológico é vital para a actividade destas moléculas. Os resultados obtidos vão de encontro aos alcançados por Lavrado, *et al.* (2013), nos quais foi demonstrada uma maior estabilização de G-quadruplexos por parte de compostos com cadeias propilamina ligadas a átomos de azoto protonáveis. (69)

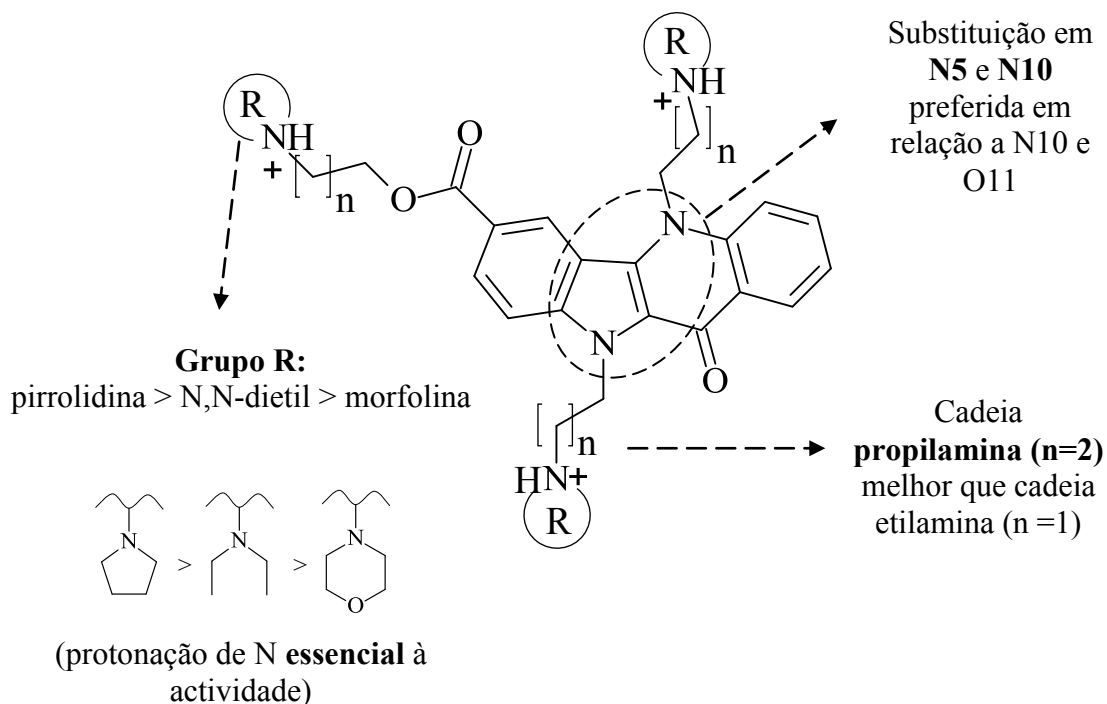


Figura 23: Resumo das relações estrutura-actividade para a série de indoloquinolinas tri-substituídas testada.

No que diz respeito à selectividade para os G-quadruplexos utilizados em relação ao ADN duplex testado, verifica-se que esta nunca é inferior a 1.9 para o G4 telomérico, a 2.1 para *K-RAS*, e a 1.8 para *HSP90*, à concentração de ligando de 2 μM . O rácio não pode ser determinado para o composto **6**, uma vez que este não aparenta estabilizar o ADN duplex. Os valores de selectividade (**Tabela 8**) sugerem uma maior afinidade dos compostos para os G4 quando comparados com ADN duplex. De igual modo, uma vez que os ensaios anteriores se processam na ausência de um mecanismo de competitividade, esta selectividade aparente poderia não corresponder à selectividade verificada na presença de ambas as formas de ADN.

De Cian, *et. al.*, (2007) (86) reportaram resultados para uma série de compostos já conhecidos por serem estabilizadores de G-quadruplexos, usando F21T como G-quadruplexo de teste, com uma concentração de 1 μM de ligando e determinação por FRET, à semelhança do que foi efectuado para os compostos **1-4** e **6-8**, como demonstrado na **Tabela 10**.

Tabela 10: Resultados obtidos por de Cian, *et. al.*, (86) para compostos estabilizadores de G-quadruplexos, à concentração de 1 μM e usando o nucleótido F21T, por FRET.

Composto	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)
BRACO-19	22,0
PIPER	23,0
Telomestatina	22,8
TMPyP4	27,4

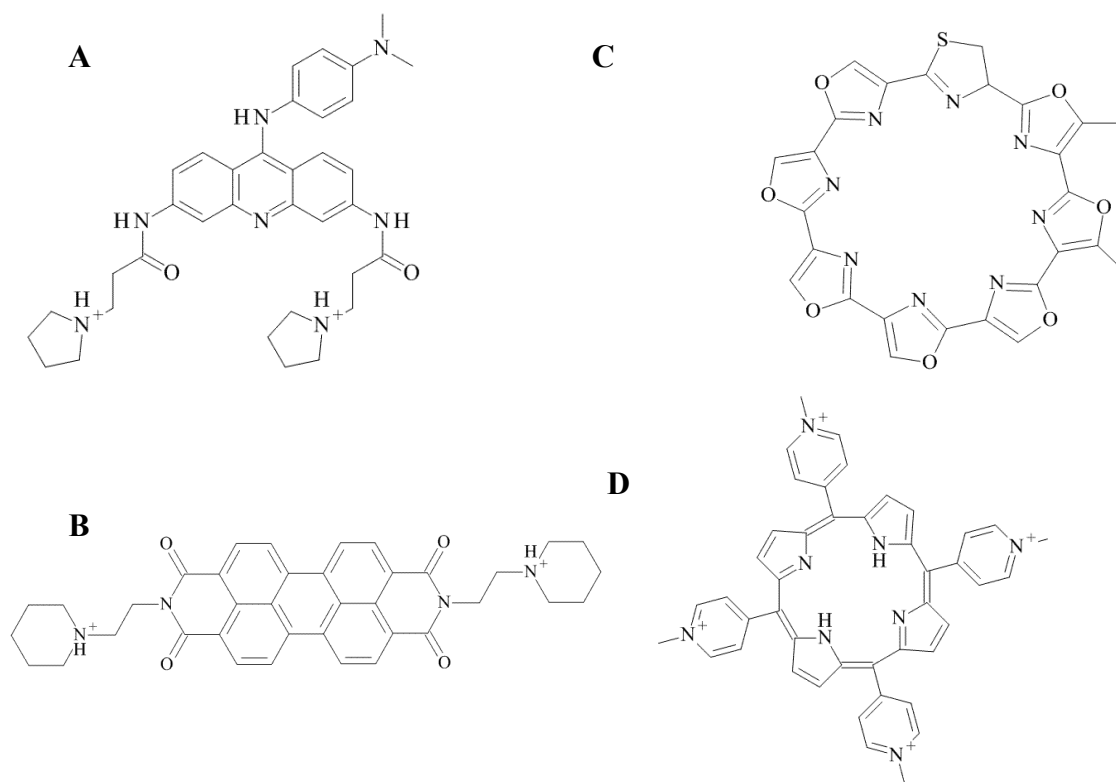


Figura 24: Compostos testados pelo grupo de de Cian (2007). (86) **A)** BRACO-19; **B)** PIPER; **C)** Telomestatina; **D)** TMPyP4.

Comparando os resultados apresentados na **Tabela 10** com os resultados obtidos para os compostos **1-4** e **6-8** (**Tabela 8**), é possível verificar que os valores de ΔT_m obtidos para a estabilização de G-quadruplexos por estes últimos são ligeiramente inferiores, com o composto **7** a obter os resultados mais próximos aos presentes na **Tabela 10**, mas precisando, para tal, usar o dobro da concentração. De entre os compostos usados no estudo do grupo de de Cian (86), aquele que apresenta mais semelhanças estruturais aos compostos sintetizados neste trabalho é o BRACO-19 (**A**). Os compostos **2** e **3**, também

com cadeia etilamina e anel terminal de pirrolidina obtiveram, contudo, valores de ΔT_m que rondam a metade dos do BRACO-19, com o dobro da concentração. Deste modo, é possível concluir que, dos compostos sintetizados, o composto **7** seria o mais indicado para possíveis ensaios futuros em células.

3.3. DOCKING MOLECULAR

Após a síntese e análise da estabilização de diversos tipos de G-quadruplexos por parte dos compostos **1-4** e **6-8**, procedeu-se ao *docking* molecular destes ligandos em estruturas de G-quadruplexos de modo a determinar os tipos de interação mais prováveis e compreender as relações de estrutura-atividade anteriormente encontradas. O método utilizado foi de *docking* semi-flexível, em que a estrutura do receptor permanece em coordenadas fixas, enquanto o ligando possui flexibilidade, podendo variar ângulos e comprimentos de ligação. (87)

Para o efeito, foram utilizadas três estruturas de G-quadruplexos teloméricos, uma antiparalela, uma paralela e uma híbrida, com os códigos PDB 143D (88), 1KF1 (44) e 2JPZ (45), respectivamente (**Figura 25**). As estruturas utilizadas foram as previamente tratadas por Lavrado, *et. al.* (2013) (54), em que nucleótidos das extremidades 5' e 3' foram removidos de modo a obter sequências de 21 nucleótidos como as usadas nos ensaios de estabilização de G-quadruplexos.

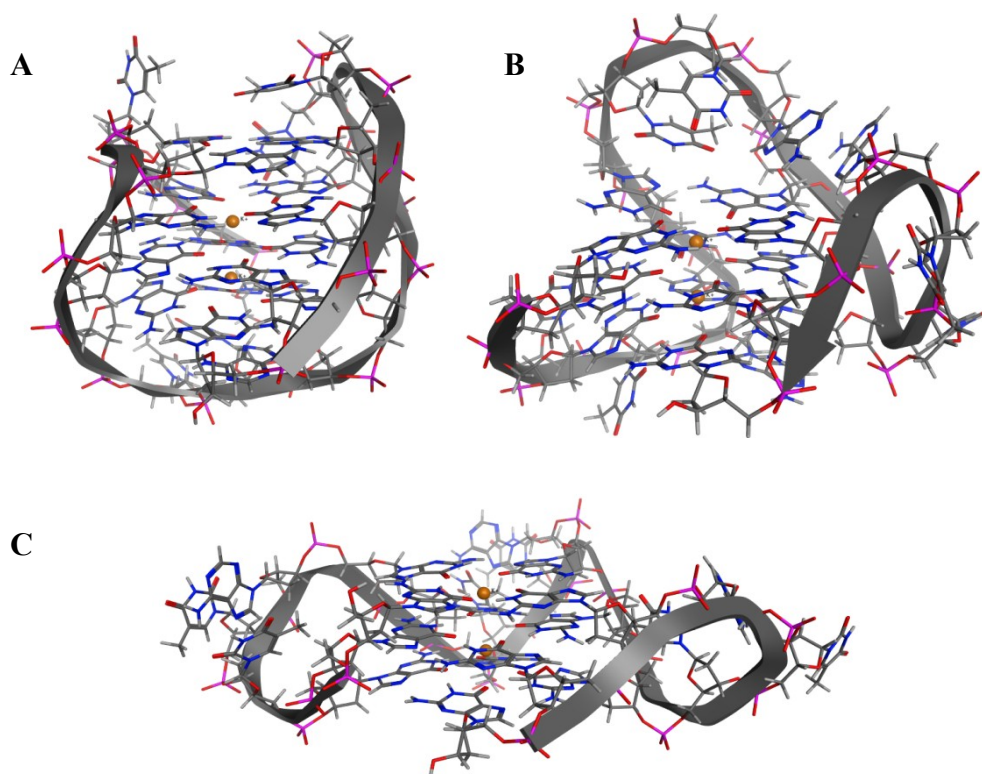










Figura 25: Estruturas de G-quadruplexos teloméricos utilizadas. **A)** Antiparalela (143D) (88); **B)** Híbrida (2JPZ) (45); **C)** Paralela (1KF1) (44).

Para cada uma das estruturas, foi inicialmente efectuado o *docking* semi-flexível dos ligandos **1** a **9** com recurso ao *software* MOE 2009.10 (89). A funcionalidade Protonate3D foi utilizada para ajustar o estado de ionização do sistema a pH 7. Contudo, dado que os ligandos **5**, **6** e **9** continuavam com protonação no anel de morfolina a esse pH, contrariando os cálculos efectuados pelo *software* SPARC (85), estes foram sujeitos a pH 12, de modo a tentar a desprotonação dos azotos terminais, que foi apenas conseguida para a cadeia do éster em todos os casos. Aos ligandos a pH 7 deu-se a designação de protonados (**5p**, **6p** e **9p**), tomando os restantes as designações **5**, **6** e **9**.

Para cada estrutura, foi designada a tétrede de guaninas do topo como sítio preferencial de ligação. Foi depois efectuado o *docking* dos ligandos em cada uma das estruturas usando as funções de *scoring* London dG ou Alpha HB, sendo o resultado sujeito a refinamento também segundo uma destas duas funções. A função London dG estima a energia livre de ligação tomando em conta a entropia do sistema, flexibilidade do ligando, ligações de hidrogénio estabelecidas e a energia de solvatação dos átomos, enquanto Alpha HB dá a energia como uma combinação linear de termos de disposição geométrica do ligando no volume do receptor e de estabelecimento de ligações de hidrogénio, cada um com diferente ponderação. (89)

Para a função Alpha HB, foram usados os parâmetros pré-definidos (*alpha*: 10; *hydrogen bonding*: 4). Para cada ensaio, foram retidas as cem melhores conformações e efectuadas contagens do número total de interacções presentes. Estes resultados encontram-se representados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Percentagens totais de interacções presentes para os cálculos iniciais.

Lig.	Tipo	R	1KF1				2JPZ				143D			
			L-L	L-AHB	AHB-L	AHB-AHB	L-L	L-AHB	AHB-L	AHB-AHB	L-L	L-AHB	AHB-L	AHB-AHB
			---	10-4	10-4	10-4	---	10-4	10-4	10-4	---	10-4	10-4	10-4
1	N, N, COOR		64%	87%	81%	80%	64%	67%	72%	68%	54%	45%	47%	51%
2	N, O, COOR		74%	85%	74%	75%	83%	82%	83%	80%	59%	48%	46%	61%
3	N, N, COOR		79%	91%	76%	78%	81%	81%	88%	82%	60%	64%	56%	55%
4	N, O, COOR		81%	85%	76%	84%	86%	86%	73%	77%	65%	59%	52%	58%
5	N, N, COOR		54%	54%	57%	54%	76%	76%	79%	76%	63%	62%	66%	55%
5p	N, N, COOR		80%	89%	69%	78%	87%	95%	77%	81%	68%	62%	59%	60%
6	N, O, COOR		67%	68%	61%	62%	70%	73%	71%	73%	66%	74%	67%	64%
6p	N, O, COOR		86%	89%	85%	86%	89%	87%	89%	87%	68%	71%	59%	67%
7	N, N, COOR		68%	89%	74%	71%	79%	78%	73%	67%	65%	71%	62%	61%
8	N, O, COOR		73%	70%	69%	71%	66%	66%	60%	60%	57%	57%	48%	60%
9	N, N, COOR		56%	57%	56%	58%	72%	69%	69%	69%	68%	74%	65%	66%
9p	N, N, COOR		79%	89%	69%	78%	86%	87%	77%	80%	77%	68%	69%	60%

Legenda: Lig.: ligando; R: cadeia lateral; L: London dG; AHB: Alpha HB. Para cada coluna, o método de *scoring* inicial e o de refinamento encontram-se separados por hífen. Os parâmetros Alpha HB são os pré-definidos (*alpha*: 10; *hydrogen bonding*: 4).

A **Tabela 11** mostra que, para as três estruturas, o método que produz melhores resultados consiste no uso de London dG como função de *scoring* e de Alpha HB como função de refinamento. A maioria dos resultados situa-se entre os 50 e os 90% para as três estruturas, com a estrutura antiparalela 143D a obter valores ligeiramente inferiores que as restantes. A observação da **Figura 25** permite verificar que esta estrutura apresenta nucleótidos acima e abaixo das tétrades de guanina que podem dificultar o acesso dos ligandos ao centro dos G-quadruplexos. Isto pode ser confirmado pela **Figura 26**, que mostra o posicionamento relativo ao G-quadruplexo da conformação com menor energia de Gibbs calculada da série London-London ($\Delta G = -12,7270$ kcal/mol) para o melhor ligando nos testes de estabilização (7).

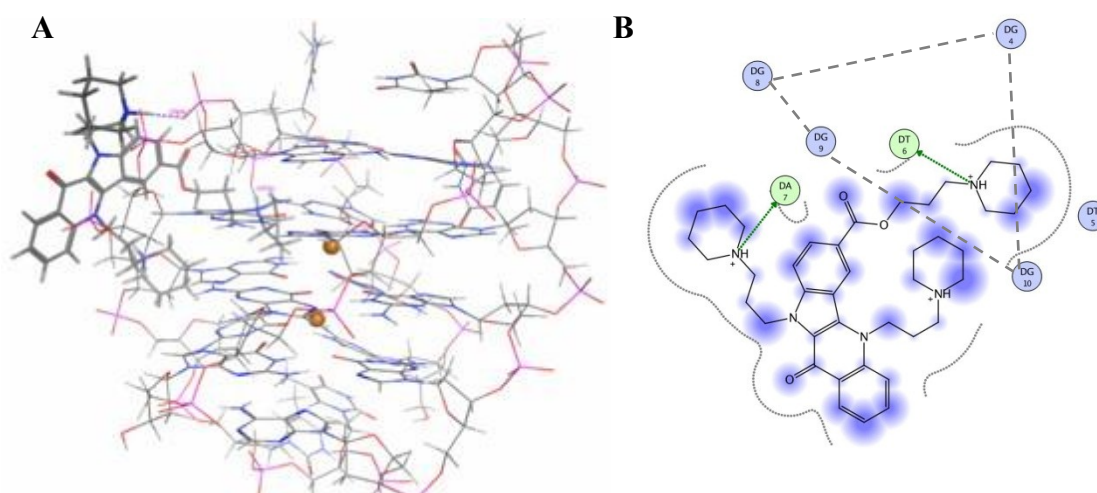


Figura 26: Representação da interacção de menor energia entre o ligando 7 e a estrutura 143D na série London-London.

A) Visualização integral das interacções ligando-G4. O ligando encontra-se representado em traço mais forte para melhor visualização; **B)** Representação esquemática das interacções. As setas a verde indicam ligação de hidrogénio e o tracejado cinzento liga a tétrade de guaninas seleccionada como sítio preferencial de posicionamento.

A figura acima permite observar que as interacções estabelecidas entre o ligando e o G-quadruplexo em questão são de carácter iónico (para detalhes sobre as percentagens específicas de interacção em cada caso, ver Anexo XVI: Tabelas de percentagens de π - π *stacking*, interacções ião-anel aromático, ligações de hidrogénio e total de conformeros do ligando com interacção com o receptor), e não abrangem a tétrade de guaninas, dando-se a ligação de hidrogénio com os grupos fosfato dos nucleótidos dA e dT localizados directamente acima dos mesmos, que exercem impedimento estérico. O ligando assume assim uma posição preferencial lateral ao G-quadruplexo. Conclui-se assim que não é possível efectuar interacções π - π entre as tétrades de guanina e o núcleo

de indolo[3,2-*b*]quinolina presente nos ligandos testados quando se recorre a esta estrutura. Por representar uma conformação antiparalela de G4, a estrutura 143D é a menos biologicamente relevante das três utilizadas, pelo que, aliado aos resultados para ela obtidos, foi decidido descartá-la de cálculos posteriores. (46)

Para as restantes duas estruturas (1KF1 e 2JPZ), foram efectuados novos ensaios, variando os valores dos parâmetros da única função editável, Alpha HB, para metade ou o dobro dos seus valores iniciais, e usando a função com os valores alterados, tanto como função de *scoring*, como de refinamento. No entanto, não foram obtidas melhorias em relação à percentagem final de conformações que mostravam possuir interacção com os G-quadruplexos.

As interacções dos ligandos com a estrutura paralela 1KF1 são efectuadas primariamente por π - π *stacking* entre os anéis de guanina e os anéis do núcleo de indolo[3,2-*b*]quinolina, acompanhadas de ligações de hidrogénio (Anexo XVI: Tabelas de percentagens de π - π *stacking*, interacções ião-anel aromático, ligações de hidrogénio e total de confórmeros do ligando com interacção com o receptor). Contudo, verifica-se também que os azotos terminais conseguem, quando protonados, estabelecer interacções π -catião, como se pode verificar pela **Figura 27** e pela **Tabela 12**.

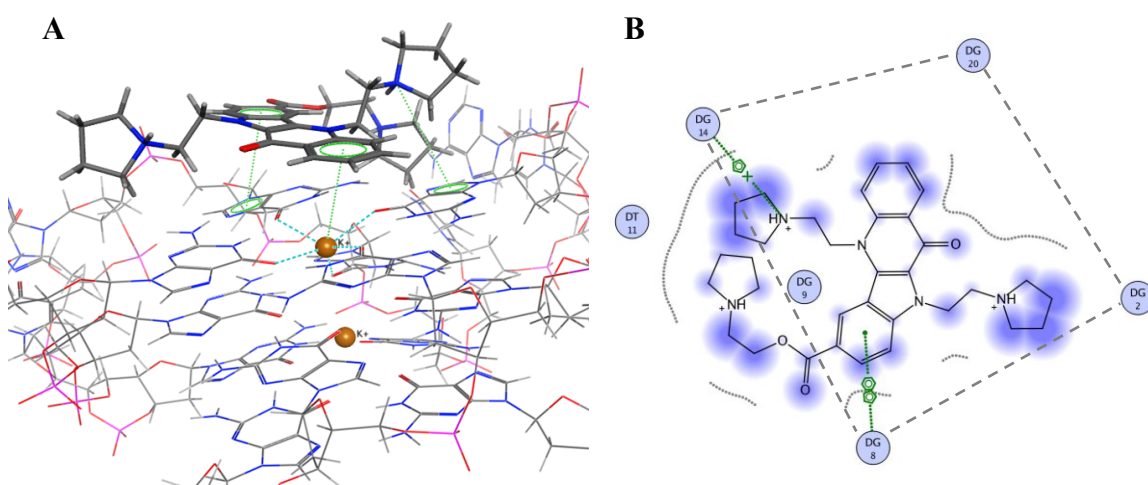


Figura 27: Interacções do ligando **3** com a estrutura 1KF1.

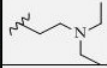
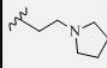

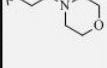
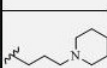
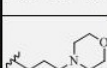
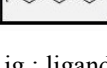
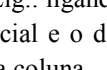
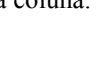

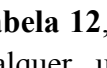
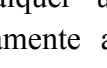
A) Representação tridimensional; B) Representação esquemática. O tracejado liga a téttrade de guaninas do topo.

A **Figura 27** mostra o ligando **3**, aquele que demonstra maiores diferenças nas percentagens de interacção quando comparado com o ligando N,O,COOR correspondente (**4**) na **Tabela 12**, a estabelecer interacções com o G-quadruplexo. Pela secção A, é possível observar o estabelecimento de uma interacção π - π entre os anéis do

ligando e de uma das guaninas do topo da estrutura. Outra guanina estabelece uma interacção π -catião com o azoto terminal de uma das cadeias. Existe ainda uma interacção semelhante entre o anel do ligando e o catião potássio coordenante da estrutura do G-quadruplexo. A secção **B** permite uma visão mais clara do posicionamento praticamente central do núcleo de indolo[3,2-*b*]quinolina em relação ao quarteto de guaninas do topo, permitindo uma maior área de contacto entre ligando e receptor.

A **Tabela 12** permite uma comparação entre os resultados obtidos usando as várias combinações de parâmetros para a função Alpha HB, de modo a tentar determinar qual a mais adequada para este tipo de ligandos.

Tabela 12: Percentagem de interacções π -catião para a estrutura 1KF1.

Lig.	Tipo	R	1KF1																	
			L-AHB						AHB-L						AHB-AHB					
			5-2	5-4	10-2	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-8	20-4	20-8
1	N, N, COOR		15%	16%	17%	15%	17%	14%	28%	26%	30%	29%	28%	28%	27%	28%	29%	27%	27%	30%
2	N, O, COOR		19%	15%	14%	16%	16%	13%	22%	26%	29%	23%	28%	16%	23%	22%	26%	25%	27%	28%
3	N, N, COOR		39%	22%	19%	18%	20%	19%	27%	21%	28%	19%	22%	24%	28%	24%	25%	22%	27%	27%
4	N, O, COOR		58%	20%	16%	22%	22%	18%	15%	15%	19%	18%	18%	22%	19%	18%	16%	15%	15%	14%
5	N, N, COOR		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
5p	N, N, COOR		16%	17%	16%	14%	15%	15%	21%	26%	23%	30%	19%	23%	25%	22%	21%	28%	25%	23%
6	N, O, COOR		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
6p	N, O, COOR		12%	13%	15%	12%	15%	15%	19%	19%	17%	21%	20%	22%	18%	25%	22%	21%	18%	22%
7	N, N, COOR		16%	16%	15%	12%	15%	17%	23%	19%	25%	28%	22%	23%	28%	19%	22%	26%	25%	25%
8	N, O, COOR		19%	19%	20%	17%	20%	19%	29%	27%	32%	26%	31%	27%	27%	25%	33%	31%	32%	30%
9	N, N, COOR		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
9p	N, N, COOR		24%	23%	22%	23%	22%	23%	15%	22%	16%	21%	14%	16%	11%	23%	19%	20%	14%	12%

Legenda: Lig.: ligando; R: cadeia lateral; L: London dG; AHB: Alpha HB. Para cada coluna, o método de *scoring* inicial e o de refinamento encontram-se separados por hífen. Os parâmetros Alpha HB variam consoante a coluna.

Na **Tabela 12**, é visível a ausência de grandes percentagens de interacções deste tipo para qualquer um dos métodos utilizados. Contudo, os métodos que utilizam exclusivamente a função Alpha HB para efectuar o *scoring* possuem, no geral, percentagens deste tipo de interacção mais elevadas quando comparadas com as funções do tipo London/Alpha HB, sendo consequentemente melhores para avaliar este tipo de interacção neste caso.

A observação da tabela permite também constatar que os ligandos com maiores percentagens para este tipo de interacção com a estrutura 1KF1 são os que possuem uma

cadeia lateral com espaçador etilo. Isto poderá dever-se ao facto de a estrutura dos ligandos ficar centrada em relação ao quadruplexo, favorecendo as interações π - π stacking e desfavorecendo as π -cатиónicas tanto mais quanto maior o espaçador que possuem. Contudo, existem excepções. A perda da protonação do azoto terminal em apenas uma das cadeias laterais, como acontece nas simulações a pH 12 com o MOE, é suficiente para que estes não apresentem este tipo de interação, presente em cerca de 15 a 30% das conformações analisadas de ligandos protonados. De entre as combinações analisadas, a que possui apenas a função Alpha HB com os valores dos parâmetros mais elevados (*alpha*: 20; *hydrogen bonding*: 8) apresenta valores ligeiramente mais elevados que as restantes. Os valores de energia livre (Anexo XVII: Tabelas de ΔG para os compostos **1-4** e **6-8**, obtidas por *docking* molecular) apresentados são também menores que os obtidos para os métodos que incluem o uso da função London dG como método de *scoring* inicial ou de refinamento.

A mesma situação verifica-se para a estrutura híbrida 2JPZ (Anexo XVI: Tabelas de percentagens de π - π *stacking*, interações ião-anel aromático, ligações de hidrogénio e total de conformeros do ligando com interação com o receptor), como demonstrado na **Figura 28**. No que toca a esta estrutura, a sua disposição híbrida faz com que existam *loops* TTA por cima das tétrades de guanina, o que não se verificava na estrutura 1KF1, onde essa zona se encontrava desimpedida. Esta situação pode criar impedimento estéreo no posicionamento dos ligandos.

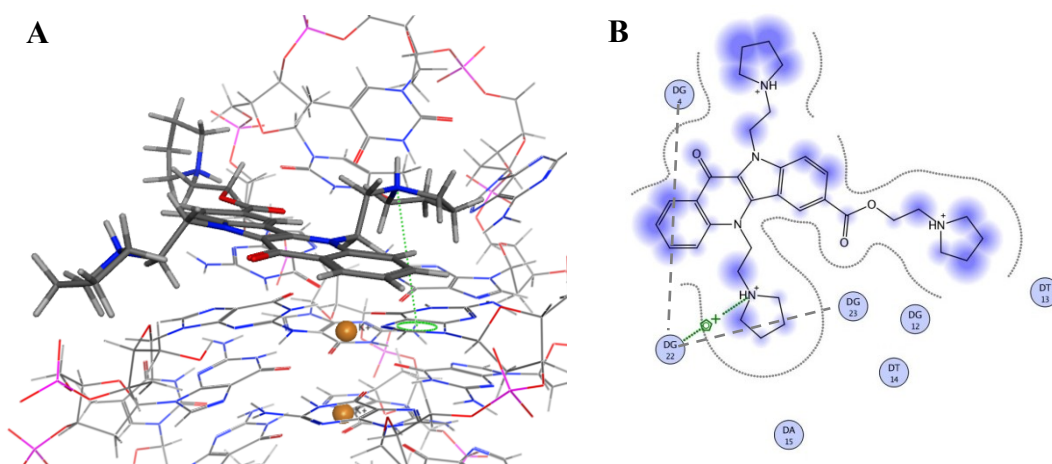


Figura 28: Interações do ligando **3** com a estrutura 2JPZ.

A) Representação tridimensional; **B)** Representação esquemática. O tracejado liga as três guaninas da tétrade representadas no diagrama de interações.

Na **Figura 28**, é possível observar que o ligando **3** se posiciona de forma menos central do que acontecia para 1KF1, não sendo visível uma das quatro guaninas da

tétrade no diagrama **B**. É também de notar que esta estrutura consegue reter interacções π -catiónicas mesmo com desprotonação parcial dos ligandos (Anexo XVI: Tabelas de percentagens de π - π *stacking*, interacções ião-anel aromático, ligações de hidrogénio e total de confórmeros do ligando com interacção com o receptor). Estes dois factores estão possivelmente relacionados devido ao diferente posicionamento que os ligandos adoptam, devido à existência de maior impedimento estéreo.

Após a conclusão de todos os ensaios, foi efectuada uma validação de cada método através do estabelecimento de rectas de correlação entre os resultados experimentais de ΔT_m e os resultados de ΔG para a melhor conformação dos ligandos **1-4** e **6-8**.

A melhor correlação entre resultados experimentais e teóricos foi obtida para a experiência que tinha como método de *scoring* Alpha HB (*alpha*: 5, *hydrogen bonding*: 4) e London dG como método de refinamento (**Gráfico 2**). Para a estrutura paralela 1KF1 foi obtido coeficiente de determinação (R^2) de 0,7577. Para a estrutura híbrida 2JPZ, nenhum dos métodos aplicados conseguiu um R^2 melhor que 0,1938 (Anexo XVIII: Gráficos de correlação entre resultados de ΔT_m e resultados de *docking* molecular), pelo que se pode concluir que os resultados obtidos com esta estrutura para esta série de compostos carecem de validação. O método é, portanto, válido apenas para a previsão de interacções do ligando à estrutura 1KF1.

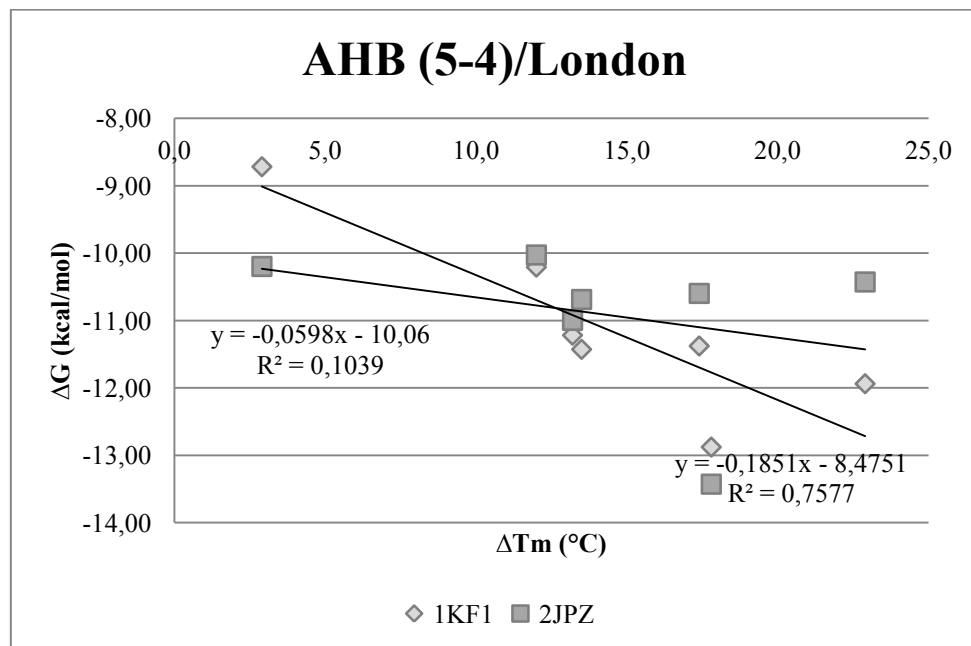


Gráfico 2: Resultados da validação do método Alpha HB (5-4)/London.

Apesar de não ter sido encontrado um método ideal para a abordagem computacional a estes compostos, existe uma tendência para uma melhoria das correlações quando a

função usada no refinamento é London dG. De igual modo, a diminuição do peso do parâmetro *alpha* na função de *scoring* inicial Alpha HB parece ter também algum impacto na melhoria dos resultados. Contudo, a alteração do valor do parâmetro correspondente ao estabelecimento de ligações de hidrogénio para um valor inferior a 4 gera piores resultados para a estrutura 1KF1.

Tendo em conta estes factores, foi testado um novo método, usando Alpha HB como função de *scoring* inicial com parâmetros *alpha* = 2 e *hydrogen bonding* = 4 (Alpha HB (2-4)) e usando a função London dG para o refinamento (**Gráfico 3**).

O uso dos novos parâmetros mostra melhorias significativas para a estrutura híbrida 2JPZ, apresentando um coeficiente de determinação entre resultados experimentais e teóricos de 0,8237. Os resultados para a estrutura paralela 1KF1 também apresentam um aumento no coeficiente de determinação, com $R^2 = 0,8344$. Estes resultados sugerem que, para efectuar o *docking* molecular destes compostos de modo a reproduzir resultados experimentais sobre a estabilização, o factor principal a ter em conta é o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre os ligandos e G-quadruplexos. Assim, as relações estrutura-actividade verificadas no *docking* confirmam as estabelecidas pelos ensaios biofísicos de estabilização de G-quadruplexos por parte dos compostos sintetizados.

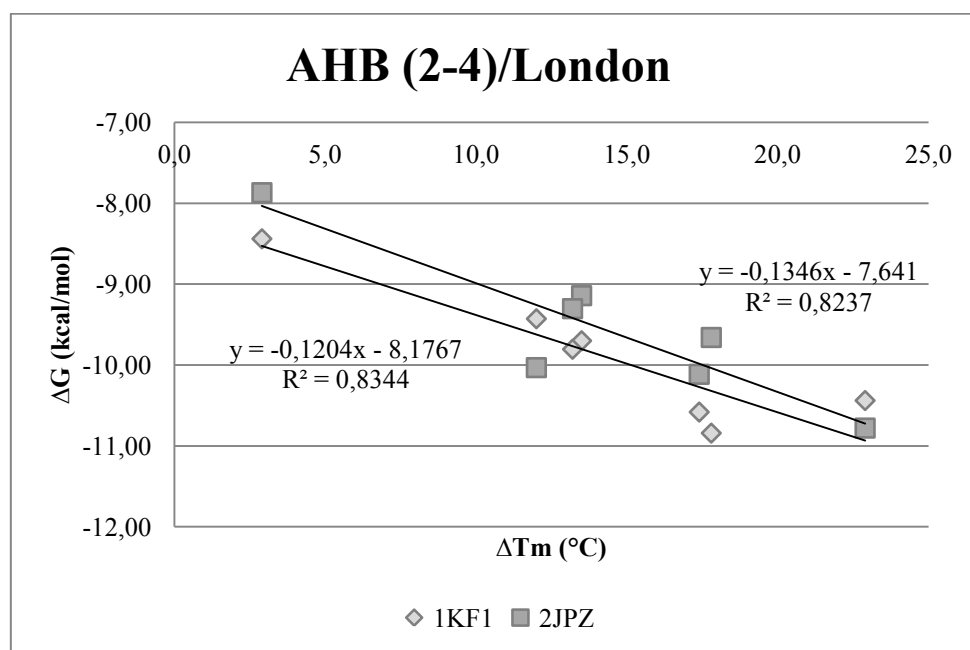
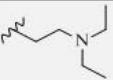
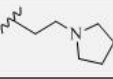
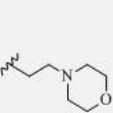
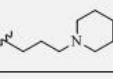
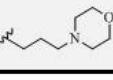


Gráfico 3: Resultados da validação do método Alpha HB (2-4)/London.

Verifica-se que a mudança de parâmetros do método Alpha HB para 2-4/London não consegue percentagens de conformeros a estabelecer interacção com as estruturas de G4 tão elevadas como métodos com parâmetros maiores (**Tabela 13**).

Tabela 13: Percentagens para cada tipo de interacção verificada usando o método Alpha HB (2-4)/London dG.

			Alpha HB (2-4)/London dG							
			1KF1				2JPZ			
Lig.	Tipo	R	Stacking	Ião-aromático	Iónico	Total	Stacking	Ião-aromático	Iónico	Total
1	N, N, COOR		41%	26%	18%	65%	17%	16%	24%	47%
2	N, O, COOR		61%	12%	19%	70%	35%	5%	24%	57%
3	N, N, COOR		47%	25%	27%	75%	16%	12%	23%	42%
4	N, O, COOR		58%	10%	18%	72%	35%	4%	27%	59%
5	N, N, COOR		61%	6%	19%	71%	24%	0%	40%	60%
5p	N, N, COOR		46%	20%	23%	66%	16%	2%	43%	53%
6	N, O, COOR		68%	11%	15%	80%	42%	0%	31%	64%
6p	N, O, COOR		60%	16%	27%	78%	26%	2%	42%	61%
7	N, N, COOR		45%	23%	27%	70%	24%	7%	33%	50%
8	N, O, COOR		48%	34%	24%	74%	30%	6%	20%	50%
9	N, N, COOR		42%	0%	10%	47%	22%	3%	40%	62%
9p	N, N, COOR		45%	7%	24%	63%	26%	6%	45%	61%

Legenda: Lig.: ligando; R: cadeia lateral.

Os dados da **Tabela 13** mostram que os ligandos possuem globalmente maiores percentagens de interacção com a estrutura 1KF1, como as de π - π *stacking* e de interacções entre os electrões π conjugados dos anéis aromáticos de guanina e as funções protonáveis dos ligandos. No entanto, para os ligandos usados na construção do **Gráfico 3**, todos os conformeros de menor energia apresentam interacções com as estruturas, como verificável na **Figura 29** para os ligandos **7** e **8**, para os quais foram obtidos os melhores valores de ΔT_m para a estrutura de G-quadruplexo telomérico. O método prova, deste modo, a sua eficácia na previsão de interacções com G4 para este tipo de compostos.

Com base no **Gráfico 3** e na **Tabela 13**, é possível estabelecer uma estimativa de relação estrutura-actividade para estes ligandos segundo o método Alpha HB (2-4)/London. Para a estrutura paralela 1KF1, os melhores valores de energia de Gibbs são atribuídos aos ligandos **8**, **3** e **7**, por esta ordem, e o pior resultado é obtido pelo ligando **6**. Já para a estrutura 2JPZ, o ligando **7** é quem obtém o melhor resultado, seguido pelos ligandos **3**, **1** e **8**, sendo o pior novamente o **6**. Os valores exactos de ΔG para cada composto que deram origem ao **Gráfico 3** encontram-se disponíveis no Anexo XVII: Tabelas de ΔG para os compostos **1-4** e **6-8**, obtidas por *docking* molecular.

Estes resultados indicam concordância com a SAR obtida experimentalmente, com os compostos de cadeia propilamina a mostrarem uma maior estabilização do G4, os compostos com anel de pirrolidina a serem os melhores de entre aqueles que possuíam cadeias etilamino. De igual modo, tanto *in silico* como na SAR experimental, foi o ligando com anel terminal de morfolina que revelou a pior estabilização dos G-quadruplexos. Para a estrutura 2JPZ, é também possível distinguir entre compostos N,N, COOR- e N,O,COOR-substituídos, com os melhores resultados para os primeiros a serem corroborados pelos resultados experimentais.

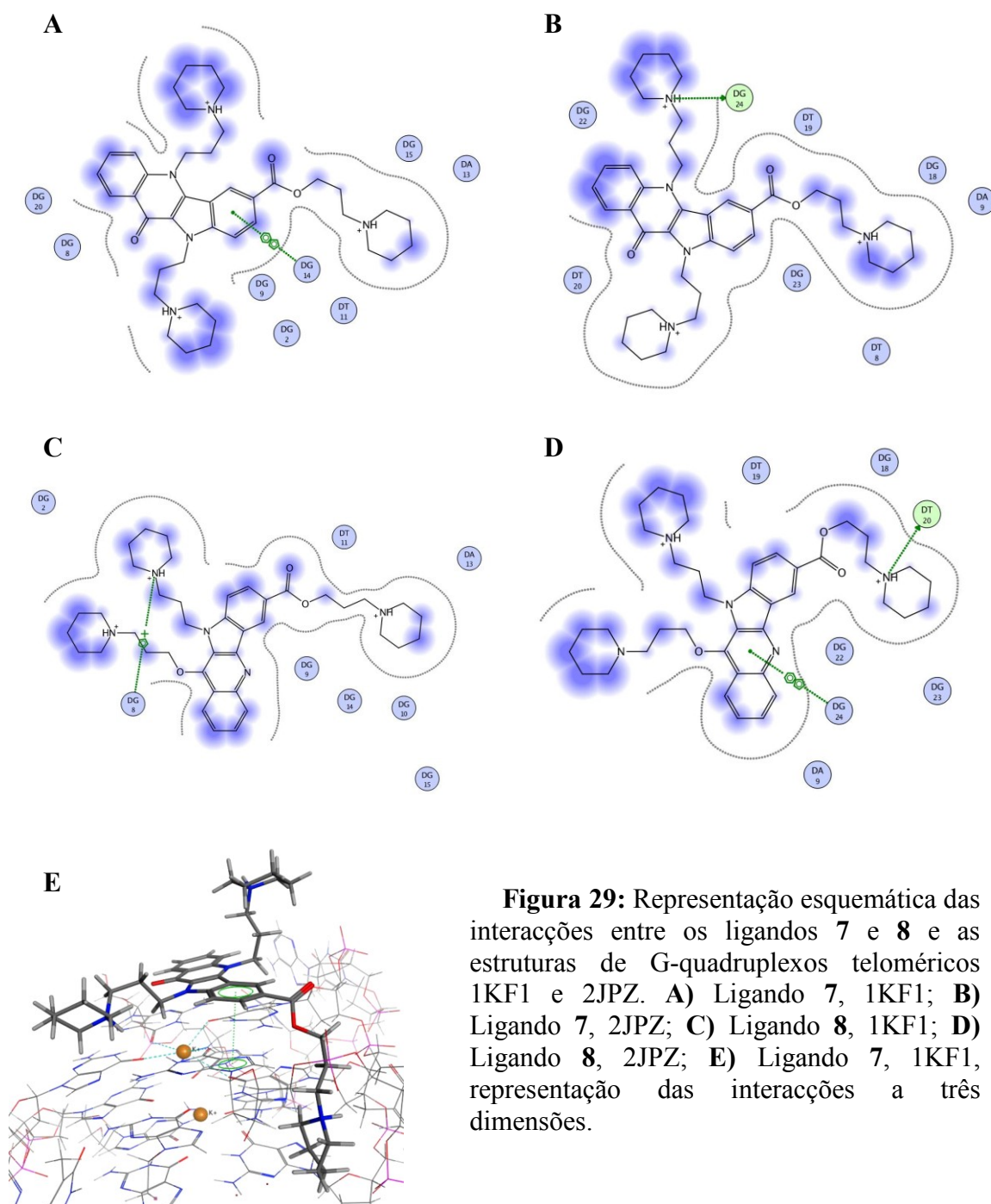


Figura 29: Representação esquemática das interações entre os ligandos 7 e 8 e as estruturas de G-quadruplexos teloméricos 1KF1 e 2JPZ. **A)** Ligando 7, 1KF1; **B)** Ligando 7, 2JPZ; **C)** Ligando 8, 1KF1; **D)** Ligando 8, 2JPZ; **E)** Ligando 7, 1KF1, representação das interações a três dimensões.

CONCLUSÕES

O cancro permanece até hoje uma das principais causas de morte a nível mundial, apesar de todo o progresso efectuado pela indústria farmacêutica e médica durante o último século, e prevalecendo nos países desenvolvidos em relação a doenças infecciosas para as quais existem tratamentos eficazes que permitem ao paciente gozar de qualidade de vida apesar de, em alguns casos, se dar a continuada inexistência de cura. (10)

Durante a última década, a comunidade científica focou alguma da sua atenção nos G-quadruplexos como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos anticancerígenos, uma vez que uma análise ao genoma humano permite a identificação de sequências potencialmente originadoras de G-quadruplexos em locais relevantes para esta terapia, como os telómeros ou regiões promotoras de oncogenes. (47, 90) A terapia passaria, então, pela estabilização destas estruturas de maior ordem de ADN por ligandos selectivos, de modo a impedir processos de proliferação celular descontrolada. (91)

Os ligandos conhecidos para G-quadruplexos possuem características próprias e adaptadas à optimização da interacção com as estruturas de G4. Na sua maioria, estes ligandos incorporam grupos aromáticos volumosos com vários anéis, de modo a permitir o estabelecimento de interacções π - π *stacking* com as tétrades de guanina. Alguns destes ligandos encontram-se estabilizados por metais com carga positiva, com o objectivo de ajudar à estabilização do G4 por coordenação com o centro metálico. A interacção com as ansas é também valorizada, levando à existência de ligandos com cadeias laterais carregadas positivamente, de modo a permitir interacções iónicas com os grupos fosfato dos diversos nucleótidos, bem como oxigénios e azotos de bases não envolvidas directamente na formação do G-quadruplexo. (53)

As indoloquinolinas são alcalóides naturais que contêm anéis fundidos de indole e quinolina. Estudos provaram que compostos deste grupo possuem propriedades antibacterianas, anti-fúngicas, anti-protozoário, no combate à hiperglicémia, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e anti-tumorais. (56) As indolo[3,2-*b*]quinolinas podem ser utilizadas enquanto estabilizadoras de G-quadruplexos, devido ao seu anel aromático tetracíclico e, em particular, permitem a substituição em três posições diferentes com grupos contendo espaçadores alifáticos e grupos terminais com átomos de azoto protonáveis. (54)

Os compostos sintetizados neste trabalho foram obtidos recorrendo à metodologia modificada de Görlitzer e Weber (68), que conduziu à síntese do composto **32** (ácido 11-oxo-5,10-dihidroindolo[3,2-*b*] quinolina-7-carboxílico), seguindo-se uma reacção com as cloroalquilaminas apropriadas de modo a obter os derivados tri-alquilamina **1** a **9** com rendimentos entre os 2 e os 22%. A perda de composto no isolamento por PTLC e a formação de produtos secundários poderão estar na origem dos baixos rendimentos.

A análise da estabilização (por análise do ΔT_m) de diferentes tipos de G-quadruplexos por parte dos compostos **1-4** e **6-8** permitiu o estabelecimento de uma SAR bem definida. Assim, verificou-se que os espaçadores alifáticos são preferencialmente de propilamina ao invés de etilamina, e os compostos N,N,COOR-substituídos mais favoráveis à estabilização de G4 em relação à substituição N,O,COOR. Quanto aos grupos azotados terminais, os melhores resultados em compostos etilamina foram obtidos para anéis de pirrolidina, seguindo-se a cadeia aberta N,N-dietilo e, por último, os anéis de morfolina. Através da relação destes resultados com os valores de pK_a calculados para os átomos de azoto das cadeias, determinou-se ainda que a protonação do mesmo a pH fisiológico é essencial para a actividade, possível razão para os maus resultados obtidos pelos compostos com anéis de morfolina. De igual modo, os ligandos provaram ser razoavelmente selectivos para estruturas G4 em detrimento da interacção com ADN duplex. Estes resultados estão de acordo com a literatura existente para derivados de indoloquinolinas, que aponta espaçadores propilo com terminações em grupos contendo átomos de azoto protonáveis como os mais vantajosos à estabilização de G-quadruplexos. (69)

Os ligandos foram igualmente analisados *in silico*, através de técnicas de *docking* molecular, de modo a determinar um conjunto de parâmetros que permitisse prever com a maior exactidão possível a estabilização de G4 por parte destes derivados de indolo[3,2-*b*]quinolina. O método optimizado com o qual se obtiveram melhores resultados para duas topologias de G4 diferentes ($R^2 = 0,8237$ e $R^2 = 0,8334$) utiliza como função de *scoring* inicial a função Alpha HB, que privilegia as ligações de hidrogénio, com parâmetro 2 para *alpha* (factores estéreos) e a pré-definição de 4 para *hydrogen bonding*. Por seu turno, o refinamento é assegurado pela função pré-definida London dG. Este método confirma a avaliação efectuada na SAR experimental, pelo que se considera um método válido para ambas as estruturas testadas, 1KF1 (paralela) e 2JPZ (híbrida).

De todos os ligandos, o composto **7**, N,N,COOR-substituído, com cadeia propilamina e grupo azotado terminal de piperidina, provou ser o mais eficaz na estabilização de G-quadruplexos, tanto por meios experimentais como computacionais. Possíveis perspectivas futuras para este trabalho poderiam, deste modo, passar pelo teste deste composto em células tumorais e de controlo, de modo a aferir o seu comportamento em cada uma das tipologias celulares. Uma vez que, até à data, nenhum ligando de G-quadruplexos foi comercializado como forma de terapia anti-tumoral, esta área é uma aposta válida para o desenvolvimento de investigação na área da química farmacêutica, tanto indirectamente, como acontece com o desenvolvimento de ligandos de G-quadruplexos para detecção dos níveis intracelulares de potássio (92), como directa, tendo como fim do estabelecimento de novas possibilidades quimioterapêuticas no combate a neoplasias (46).

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1. PRODUTOS QUÍMICOS

Reagentes: Todos os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos às companhias Sigma Aldrich e Merck e usados sem passos adicionais de purificação. Os solventes deuterados utilizados nas experiências de RMN foram dimetilsulfóxido (DMSO, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) e clorofórmio (CDCl_3), ambos da Sigma Aldrich. Os nucleótidos marcados para as experiências de FRET foram adquiridos à Eurogentec Ltd.

Água: toda a água utilizada no tratamento das reacções foi destilada e purificada por uma resina de permuta iónica (sistema MilliQ, Millipore Ltd.). A água sem nucleases usada nos ensaios de FRET foi adquirida à Ambion Applied Biosystems UK.

5.2. EQUIPAMENTOS

RMN: Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registados num espectrómetro Bruker 400 Ultrashield (400 MHz) pertencente à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Os desvios químicos são apresentados em partes por milhão (ppm), usando o solvente como padrão interno e as constantes de acoplamento (J) são apresentadas em Hertz (Hz). Os desdobramentos causados pelo acoplamento spin-spin são apresentados como s (singuleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quadruplete), quint (quintuplete) ou m (multiplete).

IV: Os espectros de infravermelho foram registados num espectrómetro Shimadzu IR-Affinity1, usando pastilhas de brometo de potássio.

Pontos de fusão: Para determinar os pontos de fusão (p.f.) foi utilizado um aparelho Bock Monoscop M, com intervalo de medição entre 0°C e 330°C .

Análise elementar: A análise elementar de C, H, N e S foi efectuada na Unidade de Análise Elementar da Universidade de Santiago de Compostela.

5.3. MÉTODOS GERAIS

TLC: O método de cromatografia em camada fina (TLC ou CCF) foi utilizado para monitorizar o prosseguimento das reacções, tendo sido utilizadas placas de sílica-gel (Merck, sílica-gel 60 F254, 200 μm de espessura, partículas de 25 μm em folha de alumínio) ou de óxido de alumínio (Sigma Aldrich, 60 Å de diâmetro de poro e 200 μm de espessura). A revelação das placas foi feita com recurso a uma câmara de UV CAMAG, nos comprimentos de onda de 254 ou 366 nm.

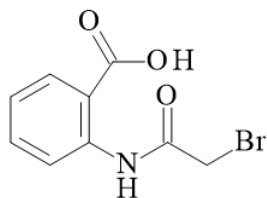
PTLC: A técnica de cromatografia em camada fina preparativa (PTLC ou CCFP) foi utilizada na purificação dos produtos finais em placas de óxido de alumínio (Merck, matriz de alumina, 250 µm de espessura e 60 Å de diâmetro de poro).

Recristalização a quente: Para obter o composto **32** puro, foi necessário recorrer à técnica de recristalização a quente. O composto resultante da reacção foi primeiramente dissolvido em cerca de 100 ml de AcOEt, juntando-se, quando necessário, algumas gotas de MeOH para ajudar à solubilização. A mistura foi depois aquecida com recurso a uma pistola de ar quente e juntou-se, aos poucos, hexano, recolhendo o primeiro sólido formado e de cor homogénea.

Formação de sais: Para obter os sais dos compostos finais **1** a **9**, foi efectuada a técnica de cristalização. Os óleos resultantes das reacções foram dissolvidos em cerca de 2 ml de DCM, sendo depois precipitados com recurso a uma mistura de éter dietílico com HCl. O solvente foi evaporado e os cristais, todos de tonalidade amarelo-clara, foram secos sob vácuo.

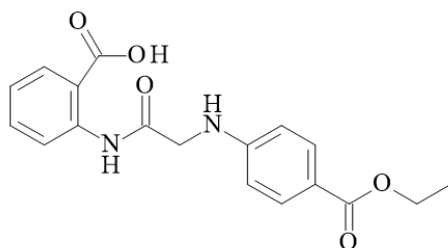
5.4. SÍNTESE DE DERIVADOS DE INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINAS

5.4.1. ÁCIDO 2-[2-(BROMOACETIL)AMINO]BENZOICO (**27**)



A 10 g (72.9 mmol) de ácido antranílico foram adicionados 30 ml de 1,4-dioxano e 30 ml de DMF. A mistura foi colocada sob agitação a 0°C e foram adicionados, gota a gota, 8 ml (1.25 eq., 91.1 mmol) de brometo de bromoacetilo. A mistura foi depois deixada sob agitação e à temperatura ambiente durante a noite. Após ser retirada da agitação, a mistura foi adicionada a aproximadamente 600 ml de água destilada, obtendo-se o composto **27** como um precipitado branco, que foi depois filtrado a vácuo e seco (18.60 g, 99%, p.f.: 163-165°C). ¹H RMN (400 MHz, DMSO), δ_H (ppm): 11.19 (s, NH), 8.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 3.86 (s, 2H). IV (KBr, cm⁻¹): 3400 (NH ou (CO)O-H *st.*), 1691 (CO), 1635 (CO), 753 (aromáticos *orto* ou CH₂-Br).

5.4.2. ÁCIDO 2-{[2-(4-ETOXICARBONILANILINO)ACETIL]AMINO} BENZOICO (**30**)



A reacção de formação do composto **30** foi alvo de diversas abordagens, descritas na **Tabela 14**, que podem ser resumidas em dois procedimentos gerais: **A** (condições térmicas) e **B** (reacções por micro-ondas).

Procedimento geral A (condições **A** a **D**): A 3 g (11,6 mmol) de composto **27** são adicionados os equivalentes estipulados de benzocaína (**28**), em 50 ml de solvente, com ou sem adição de base, e colocado sob agitação à temperatura desejada com recurso a banho de óleo.

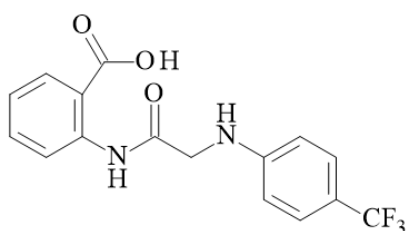
Procedimento geral B (condições **E** a **H**): A 3 g (11,6 mmol) de composto **27** são adicionados 3,5 eq (40,7 mmol) de benzocaína (**28**), em 50 ml de DMF. A mistura é levada ao micro-ondas pelo tempo e temperatura especificados, a 300 W e em modo de sistema aberto, com agitação média.

O processo de isolamento utilizado é comum a ambos os procedimentos: após parar a reacção, a mistura foi adicionada a cerca de 300 ml de água destilada e colocada a pH 8-10 com auxílio de NaOH 10%, extraíndo-se com 3 x 100 ml de diclorometano ou éter dietílico. A fase aquosa é depois colocada a pH 1 com recurso a HBr 10%, obtendo-se o produto sob a forma de um precipitado de tons creme. O composto **30** é posteriormente filtrado e seco (2,45 g, 61.53%, p.f.: 190-193°C). ¹H RMN (400 MHz, DMSO), δ_H (ppm): 11,99 (s, NH), 8,79 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,02 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,70 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,40 (t, $J = 4,9$ Hz, NH), 7,24 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,30 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,06 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H), 1,35 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). IV (KBr, cm^{-1}): 3373 (NH ou COO-H *st.*), 3257 (NH ou COO-H *st.*), 1698 (CO), 1668 (CO), 1618 (CO), 771 (aromáticos *para*), 757 (aromáticos *orto*).

Tabela 14: Condições reaccionais utilizadas na obtenção do composto **30**.

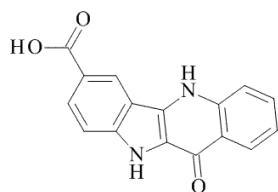
	Benzocaína (eq.)	Solvente	Base	Condições reaccionais	Isolamento	η (%)
A	1.5	ACN	TEA (1.5 eq.)	Refluxo, 168h	---	Não reagiu
B	2.5	ACN	TEA(1.5 eq.)	Refluxo, 168h	DCM	1
C	1.2	DMF	---	150°C, 72h	---	Não reagiu
D	3.5	DMF	---	120°C, 144h	Éter dietílico	38
E	3.5	DMF	---	MW (300 W), 130°C, 3h	Éter dietílico	24
F	3.5	DMF	---	MW (300 W), 135°C, 3h	Éter dietílico	38
G	3.5	DMF	---	MW (300 W), 140°C, 3h	Éter dietílico	59
H	3.5	DMF	---	MW (300 W), 140°C, 4h	Éter dietílico	62

5.4.3. ÁCIDO 2-{[2-(4-TRIFLUOROMETIL)ANILINO]ACETIL} AMINOBENZÓICO
(**31**)



O composto **7** foi sintetizado de acordo com o **Procedimento geral A**, usando 1,2 eq. (13,9 mmol) de 4-(trifluorometil)anilina (**29**), e acetonitrilo como solvente, em refluxo, por 72 h. O procedimento de isolamento foi o descrito em **5.4.2.**, sendo DCM o solvente utilizado nas extracções. O composto **31** foi obtido como um sólido amarelado, impuro, com um rendimento de 0,25% (10 mg, 2,96 μ mol). ^1H RMN (400 MHz, DMSO), δ_{H} (ppm): 11,92 (s, NH), 8,70 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,95 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,60 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,16 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 3,96 (s, 2H).

5.4.4. ÁCIDO 11-OXO-5,10-DIHIDROINDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXÍLICO (**32**)



Ao composto **30** (2 g, 7,14 mmol) foi adicionado PPA na proporção de 1:30 (m/m), sendo a mistura reaccional levada a 130°C durante 2 horas, sob agitação. O isolamento foi tentado através de procedimentos envolvendo extracções em que a fase aquosa era colocada a pH 4 e a pH 7 (**Procedimentos gerais C e D**, respectivamente). O produto **32** puro foi obtido após recristalização por gradiente térmico com AcOEt/hexano.

Procedimento geral C: a mistura foi adicionada quente a 800 ml de água destilada e colocada a pH 4 com recurso a uma solução saturada de KOH. Procedeu-se a uma extracção com 4 x 200 ml de AcOEt, sendo a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro e evaporada para dar origem ao produto **32** como um sólido amarelo (20,71%, 1,21 mmol).

Procedimento geral D: a mistura foi adicionada quente a 800 ml de água destilada e colocada a pH 7 com recurso a uma solução saturada de KOH. Procedeu-se a uma extracção com 4 x 200 ml de AcOEt, seca com sulfato de sódio anidro, e evaporada para dar origem ao produto **32** como um sólido amarelo-torrado (6,62%, 0,58 mmol).

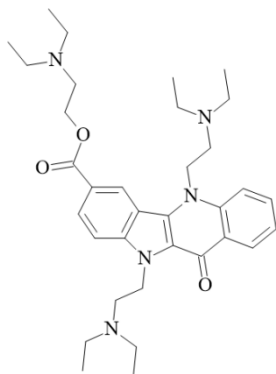
P.f. 294-297°C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO), δ_H (ppm): 12,71 (s, NH), 12,12 (s, NH), 8,99 (s, 1H), 8,34 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,72 (m, 2H), 7,57 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H). IV (KBr, cm^{-1}): 3417 (NH ou COO-H *st.*), 3218 (NH ou COO-H *st.*), 1663 (CO), 1605 (CO).

5.5. ALQUILAÇÃO DO ÁCIDO 11-OXO-5,10-DIHIDROINDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXÍLICO

Procedimento geral E: A 50, 70 ou 100 mg de composto **32** foram adicionados 6 equivalentes de cloroaquilamina, e 15 equivalentes de K₂CO₃. À mistura juntaram-se 25 ml de acetona, e a suspensão foi colocada em refluxo, sob agitação, por períodos compreendidos entre as 22 e as 46 horas, dependendo da reacção. Após parada a reacção, a acetona foi evaporada a vácuo e juntaram-se 30 ml de água destilada ao remanescente. Procedeu-se a extracção com 3 x 50 ml de DCM, adquirindo a fase orgânica uma tonalidade amarelo-clara. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e evaporada sob pressão. O óleo resultante, de tom castanho, foi dissolvido

em 2 ml de DCM e aplicado em placas de PTLC de alumina, com eluente e número de corridas variáveis. Os eluentes usados na desadsorção das manchas foram também diferentes, podendo a mistura ser ou não sonicada. As bandas isoladas foram aquelas que se verificou, por TLC, estarem em maior concentração (produtos maioritários).

5.5.1. 11-OXO-INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 2-(DIETILAMINO)ETIL-5,10-BIS[2-(DIETILAMINO)ETILO] (**1**)



O composto **1** foi sintetizado de acordo com o **Procedimento geral E**, partindo de 70 mg de **32** e usando hidrócloro de 2-cloro-(*N,N*-dietil)etilamina. A reacção demorou 24 horas. Foi efectuada uma purificação primária, por PTLC usando AcOEt : hexano (7:3) como eluente e tendo-se obtido duas manchas maioritárias. Cada mancha foi desadsorvida da alumina com recurso a uma solução de DCM : acetona (9:1), sonicada, filtrada a vácuo e evaporada. A composição quantitativa das duas manchas encontra-se descrita na **Tabela 15**.

Tabela 15: Manchas maioritárias obtidas após PTLC primária do composto **1**.

R _F	Produto (mg)
0,3	2,0
0,8	63,7

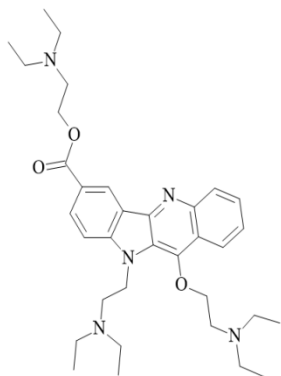
A mancha a R_F 0,8 foi sujeita a ¹H RMN, verificando-se tratar-se de uma mistura de compostos. Foi então efectuada uma PTLC, com eluente AcOEt : hexano (6:4), que deu origem a duas outras manchas, como descrito na **Tabela 16**.

Tabela 16: Manchas obtidas após PTLC secundária do composto **1**.

R _F	Produto (mg)
0,4	20,4
0,7	18,5

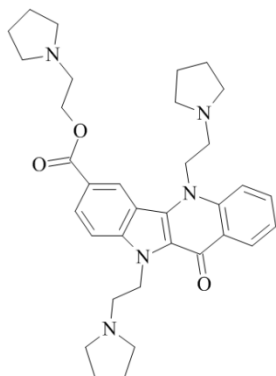
As manchas obtidas sofreram o mesmo tratamento que para a PTLC primária, sendo ambas enviadas para ^1H RMN. O produto **1** foi obtido a partir da mancha a R_F 0,4, sob a forma de um óleo amarelo (20,4 mg, 14,2%, p.f._{sal} 175-179°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 8,98 (s, 1H), 8,62 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,69 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 7,57 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,33 (m, 1H), 4,97 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 4,84 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,44 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,01 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,92 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,89 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,72 (m, 4H), 2,65 (m, 8H), 1,07 (m, 12H), 1,01 (m, 6H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_C (ppm): 169,05, 166,79, 141,65, 139,69, 131,74, 131,34, 128,08, 126,75, 125,84, 125,09, 123,16, 121,55, 121,43, 114,88, 114,43, 110,37, 63,18, 53,13, 51,16, 50,81, 47,79, 47,60, 47,49, 47,30, 43,36, 12,01, 11,89, 11,78. IV (KBr, cm^{-1}): 3428 (NH ou COO-H *st.*), 1707 (CO), 1618 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3\text{HCl} + 5,2\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{DMSO}$): C 52,21%, H 8,09%, N 8,90%, S 0,20%; Encontrado: C 52,21%, H 7,83%, N 8,55%, S 0,22%.

5.5.2. 11-[2-(DIETILAMINO)ETOXI]-10-[2-(DIETILAMINO)ETIL]INDOLO [3,2-B]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 2-(DIETILAMINO)ETILO (**2**)



O composto **2** foi obtido a partir do procedimento descrito em 5.5.1., correspondendo à mancha a R_F 0,7 resultante da PTLC secundária e sendo um óleo amarelo (18,5 mg, 12,8%, p.f._{sal} 134-138°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 9,22 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 8,37 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,33 (dd, $J = 7,8, 1,5$ Hz, 1H), 8,31 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 7,68 (dd, $J = 8,3, 6,3$ Hz, 1H), 7,57 (ddd, $J = 8,3, 6,8$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,70 (t, $J = 7,2, 7,2$ Hz, 2H), 4,47 (t, $J = 6,6, 6,6$ Hz, 2H), 4,29 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,05 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,94 (t, $J = 6,6, 6,6$ Hz, 2H), 2,80 (t, $J = 7,2, 7,2$ Hz, 2H), 2,67 (m, 8H), 2,55 (q, $J = 7,1, 7,1, 7,1$ Hz, 4H), 1,10 (m, 12H), 0,91 (t, $J = 7,1, 7,1$ Hz, 6H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_C (ppm): 166,94, 148,23, 147,47, 146,40, 145,26, 131,25, 129,56, 127,29, 125,40, 125,18, 124,49, 122,47, 122,27, 121,94, 121,50, 109,05, 74,89, 62,97, 53,07, 52,06, 51,23, 47,87, 47,75, 47,66, 43,99, 29,81, 21,45, 12,12, 12,01, 11,93. IV (KBr, cm^{-1}): 3422 (NH), 2925 (C-O), 1710 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3,15\text{HCl} + 5,3\text{H}_2\text{O}$): C 51,94%, H 8,06%, N 8,91%. Encontrado: C 51,82%, H 6,12%, N 8,58%.

5.5.3. 11-OXO-5,10-BIS(2-PIRROLIDIN-1-ILETIL)INDOLO[3,2-*B*] QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 2-PIRROLIDIN-1-ILETILO (**3**)



O composto **3** foi sintetizado de acordo com o **Procedimento geral E**, partindo de 71 mg de **32** e usando hidrocloreto de 1-(2-cloroetil)pirrolidina como alquilamina. A reacção demorou 24 horas. Efectuou-se uma purificação primária por PTLC usando como eluente AcOEt : hexano (8:2), dando origem a seis manchas. Cada mancha foi desadsorvida duas vezes da alumina com recurso a uma solução de DCM : MeOH (9:1). A composição quantitativa das seis manchas encontra-se descrita na **Tabela 17**.

Tabela 17: Manchas obtidas após PTLC primária do composto **3**.

R _F	Produto (mg)
0	<5
0,2	21,0
0,4	23,4
0,6	<5
0,7	<5
0,9	<5

Por TLC, verificou-se que cada uma das duas manchas principais da PTLC primária continha, na realidade, mais do que uma mancha, pelo que se realizou uma nova PTLC secundária, com o mesmo eluente, para cada uma.

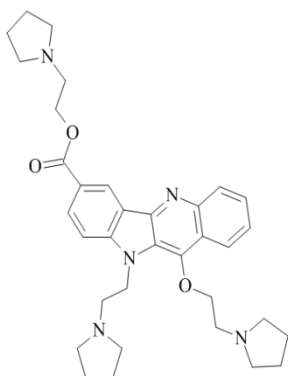
A PTLC secundária realizada a partir da mancha a R_F 0,2 da PTLC primária deu origem a duas outras manchas principais, que sofreram o mesmo tratamento que as da PTLC primária (**Tabela 18**).

Tabela 18: Manchas obtidas após PTLC secundária (R_F 0,2) do composto **3**.

R_F	Produto (mg)
0,3	<5
0,4	8,3
0,6	11,4
0,8	<5

Por ^1H RMN, verificou-se que a mancha a R_F 0,4 da PTLC secundária continha o composto **3**, que foi isolado sob a forma de um óleo amarelo (8,3 mg, 5,7%, p.f._{sal} 183-186°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 9,04 (s, 1H), 8,65 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,20 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 3,4$ Hz, 2H), 7,63 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,37 (ddd, $J = 7,9, 3,4, 3,4$ Hz, 1H), 5,09 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 4,93 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H), 4,52 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,15 (t, $J = 8,1$ Hz, 2H), 3,02 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,92 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,82 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H), 2,74 (m, 4H), 2,65 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H), 1,92 (m, 4H), 1,82 (m, 8H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_C (ppm): 169,27, 166,88, 141,67, 139,82, 132,07, 131,57, 128,45, 126,98, 126,02, 125,35, 123,25, 121,87, 121,69, 115,06, 114,44, 110,39, 64,22, 56,13, 54,85, 54,80, 54,78, 54,50, 53,23, 47,56, 44,15, 23,89, 23,74, 23,70. IV (KBr, cm^{-1}): 3424 (NH ou COO-H *st.*), 1710 (CO), 1617 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3,4\text{HCl} + 3,6\text{H}_2\text{O}$): C 53,83%, H 7,14%, N 9,23%; Encontrado: C 53,87%, H 5,89%, N 8,20%.

5.5.4. 11-(2-PIRROLIDIN-1-ILETOXI)-10-(2-PIRROLIDIN-1-ILETIL) INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 2-PIRROLIDIN-1-ILETILO (**4**)



O composto **4** foi obtido a partir do procedimento descrito em 5.5.3.. A PTLC secundária realizada a partir da mancha a R_F 0,4 da PTLC primária deu origem a duas manchas, que sofreram o mesmo tratamento que as anteriores (Tabela 19).

Tabela 19: Manchas obtidas após PTLC secundária (R_F 0,4) do composto **4**.

R_F	Produto (mg)
0,7	<5
0,8	0,1
0,9	3,4

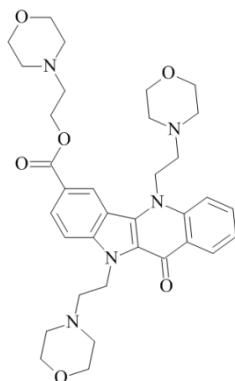
Por ^1H RMN, verificou-se que a fracção com R_F 0,9 desta PTLC continha o composto **12**. Por outro lado, foi feita uma PTLC terciária com a mancha a R_F 0,7, já que uma TLC à mesma revelou a presença de três manchas distintas, o que se verificou também na PTLC efectuada. O eluente utilizado foi AcOEt : hexano (7:3) e o tratamento das manchas foi igual aos aplicados em 5.5.3.. Os resultados da PTLC terciária encontram-se representados na **Tabela 20**.

Tabela 20: Manchas obtidas após PTLC terciária (R_F 0,7 da PTLC secundária a R_F 0,4) do composto **4**.

R_F	Peso (mg)
0	3,8
0,3	5,4
0,8	1,1

A análise por ^1H RMN revelou a presença adicional do composto **4** na mancha a R_F 0,3, que se juntou ao já isolado, com aparência de um óleo amarelo (8,8 mg, 3,7%, p.f._{sal} 159-164°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 9,23 (s, 1H), 8,32 (dd, $J = 8,6, 7,0$ Hz, 3H), 7,69 (dd, $J = 7,6, 7,0$ Hz, 1H), 7,57 (dd, $J = 7,6, 7,0$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 4,80 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,53 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 4,38 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,10 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 2,95 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,89 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,67 (t, $J = 5,4$ Hz, 8H), 2,61 (t, $J = 5,2$ Hz, 4H), 1,83 (m, 8H), 1,78 (m, 4H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_C (ppm): 166,90, 148,24, 147,26, 146,46, 145,21, 131,46, 129,62, 127,34, 125,31, 125,29, 124,53, 122,48, 122,29, 122,13, 121,40, 108,91, 75,12, 64,06, 55,90, 54,89, 54,82, 54,78, 54,63, 44,42, 23,74, 23,71, 23,68. IV (KBr, cm^{-1}): 3426 (NH ou COO-H *st.*), 1718 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3\text{HCl} + 11,3\text{H}_2\text{O}$): C 46,26%, H 7,85%, N 7,94%; Encontrado: C 46,27%, H 4,79%, N 7,56%.

5.5.5. 5,10-BIS(2-MORFOLINOETIL)-11-OXO-INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 2-MORFOLINOETILO (**5**)



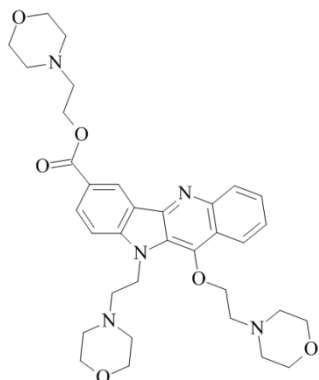
O composto **5** foi sintetizado de acordo com o **Procedimento geral E**, partindo de 100 mg de **32** e usando hidrocloreto de 4-(2-cloroetil)morfolina. A reacção demorou 55 horas. Foram efectuada uma purificação primária por PTLC, tendo como eluente AcOEt : hexano (7:3) e dando origem a quatro manchas. Cada mancha foi desadsorvida duas vezes da alumina com recurso a uma solução de DCM : MeOH (9:1), sem sonicação, filtrada a vácuo e evaporada. A composição quantitativa das manchas encontra-se descrita na **Tabela 21**.

Tabela 21: Manchas obtidas após PTLC primária do composto **5**.

R _F	Produto (mg)
0	7,2
0,1	25,3
0,35	24,5
0,8	2,1

Por TLC, verificou-se a presença de apenas uma mancha nas fracções com R_F 0,1 e 0,8, que foram sujeitas a ¹H RMN. Verificou-se que a mancha a R_F mais baixo continha o produto (25,3 mg, 11%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 9,00 (s, 1H), 8,63 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,53 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J* = 8,1, 7,0 Hz, 1H), 5,01 (m, 2H), 4,89 (m, 2H), 4,51 (t, *J* = 6,1, 6,1 Hz, 2H), 3,79 (t, *J* = 3,8, 3,8 Hz, 4H), 3,73 (t, *J* = 4,4, 4,4 Hz, 4H), 3,64 (t, *J* = 3,2, 3,2 Hz, 4H), 3,01 (t, *J* = 7,0, 7,0 Hz, 2H), 2,82 (t, *J* = 5,6, 5,6 Hz, 4H), 2,69 (m, 4H), 2,58 (m, 8H). ¹³C (101 MHz, CDCl₃), δ_C (ppm): 169,25, 166,66, 141,66, 139,76, 132,05, 131,40, 128,01, 126,91, 126,06, 125,26, 123,24, 121,77, 121,68, 115,07, 114,31, 110,33, 67,05, 67,01, 62,40, 58,53, 57,36, 55,87, 54,25, 54,07, 54,03, 46,42, 42,63.

5.5.6. 11-(2-MORFOLINOETOXI)-10-(2-MORFOLINOETIL)INDOLO[3,2-*B*]
QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 2-MORFOLINOETILO (**6**)



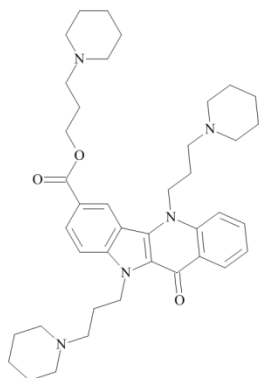
O composto **6** foi sintetizado de acordo com 5.5.5.. A mancha a R_F 0,35 foi aplicada numa PTLC secundária, usando o mesmo eluente da primária, que deu origem a cinco manchas (Tabela 22). O tratamento efectuado para as mesmas foi igual ao aplicado anteriormente.

Tabela 22: Manchas obtidas após PTLC secundária do composto **6**.

R_F	Produto (mg)
0,1	<5
0,3	12,1
0,5	0,9
0,6	<5
0,7	<5

A análise da mancha a R_F 0,3 demonstrou a presença do composto **6** sob a forma de um óleo amarelo (12,1 mg, 5,2%, p.f._{sal} 141-145°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 9,21 (s, 1H), 8,33 (m, 3H), 7,70 (dd, $J = 7,6, 7,0$ Hz, 1H), 7,58 (dd, $J = 7,6, 7,0$ Hz, 1H), 7,48 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,78 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 4,52 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 4,36 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,74 (t, $J = 4,6$ Hz, 8H), 3,54 (t, $J = 4,0$ Hz, 4H), 2,92 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,84 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 2,75 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 2,60 (m, 8H), 2,46 (t, $J = 4,0$ Hz, 4H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_C (ppm): 166,82, 148,27, 147,52, 146,52, 145,21, 131,35, 129,69, 127,46, 125,44, 124,53, 122,39, 122,16, 121,32, 109,04, 73,20, 67,10, 67,05, 67,00, 62,27, 58,66, 57,45, 54,32, 54,06, 42,93. IV (KBr, cm^{-1}): 3436 (NH ou COO-H *st.*), 1718 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3,1\text{HCl} + 5,6\text{H}_2\text{O}$): C 49,10%, H 6,96%, N 8,42%; Encontrado: C 49,12%, H 5,25%, N 7,62%.

5.5.7. 11-OXO-5,10-BIS[3-(1-PIPERIDIL)PROPIL]INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 3-(1-PIPERIDIL)PROPILO (7)



O composto **7** foi sintetizado de acordo com o **Procedimento geral E**, partindo de 69,7 mg de **32** e usando hidrocloreto de 1-(3-cloropropil)piperidina. A reacção demorou 46 horas. Foi efectuada uma purificação primária por PTLC, tendo como eluente AcOEt e dando origem a quatro manchas. Cada mancha foi desadsorvida duas vezes da alumina com recurso a uma solução de DCM : MeOH (9:1). A composição quantitativa das manchas encontra-se descrita na **Tabela 23**.

Tabela 23: Manchas obtidas após a PTLC primária do composto **7**.

R _F	Produto (mg)
0,3	<5
0,5	56,2
0,8	40,5
1,0	<5

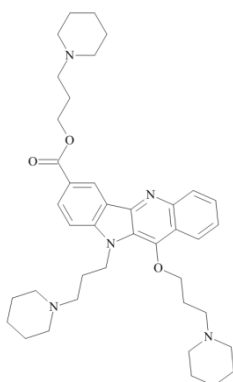
Por TLC, verificou-se a existência de produtos maioritários em mistura nas manchas a R_F 0,5 e 0,8, pelo que cada uma destas manchas foi submetida a uma preparativa secundária, sendo o eluente utilizado, em ambos os casos, de AcOEt : hexano (9,5:0,5). Os resultados para a PTLC da mancha a R_F 0,5 encontram-se explicitados na **Tabela 24**.

Tabela 24: Manchas obtidas após a PTLC secundária do composto **7**.

R _F	Produto (mg)
0,6	17,0
0,7	19,6
0,8	5,1

Por ^1H RMN, verificou-se que as manchas a R_F 0,6 e 0,7 continham o composto **7**, que se apresentava sob a forma de um óleo amarelo (36,6 mg, 22,3%, p.f._{sal} 168-170°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 8,85 (s, 1H), 8,64 (dd, $J = 7,8, 1,5$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,71 (ddd, $J = 8,8, 7,8, 1,5$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,35 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,96 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 4,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 4,42 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,56 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,51 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,44 (m, 8H), 2,37 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H), 2,26 (quint, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,15 (quint, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,04 (quint, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,61 (m, 12H), 1,45 (quint, $J = 5,8$ Hz, 6H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_C (ppm): 169,23, 167,05, 141,83, 139,96, 131,70, 131,46, 127,81, 126,81, 125,85, 125,29, 123,44, 121,52, 121,47, 114,91, 114,84, 110,72, 63,77, 56,14, 55,79, 55,57, 54,82, 54,79, 54,52, 45,91, 43,20, 28,11, 26,65, 26,20, 26,03, 25,96, 24,57, 24,49. IV (KBr, cm^{-1}): 3442 (NH ou COO-H *st.*), 1706 (CO), 1616 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3\text{HCl} + 5,5\text{H}_2\text{O}$): C 55,65%, H 8,08%, N 8,11%; Encontrado: C 55,65%, H 6,16%, N 7,84%.

5.5.8. 11-[3-(1-PIPERIDIL)PROPOXI]-10-[3-(1-PIPERIDIL)PROPILO] INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 3-(1-PIPERIDIL)PROPILO (**8**)



O composto **8** foi obtido a partir do procedimento descrito em 5.5.6.. A PTLC secundária realizada a partir da mancha a R_F 0,8 da PTLC primária deu origem a três manchas, que sofreram o mesmo tratamento que as anteriores (**Tabela 25**).

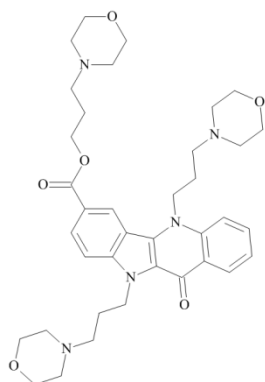
Tabela 25: Manchas obtidas após PTLC secundária (R_F 0,4) do composto **8**.

R_F	Produto (mg)
0,8	10,1
0,9	17,7
1,0	2,2

Por ^1H RMN, verificou-se que a mancha a R_F 0,9 continha o composto **8** sob a forma de um óleo amarelo (17,7 mg, 10,8%, p.f._{sal} 124-128°C). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ_H (ppm): 9,21 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 8,32 (dd, $J = 6,8, 1,7$ Hz, 2H), 8,30 (dd, $J = 5,2, 1,1$ Hz, 1H), 7,68 (ddd, $J = 8,7, 7,5, 1,1$ Hz, 1H), 7,56 (d, $J = 6,8, 1,1$ Hz, 1H), 4,63 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 4,42 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H), 4,28 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 2,67 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H),

2,55 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,23 (quint, $J = 6,6$ Hz, 6H), 2,05 (quint, $J = 6,6$ Hz, 4H), 1,63 (m, 8H), 1,54 (quint, $J = 5,4$ Hz, 6H). ^{13}C (101 MHz, CDCl_3), δ_{C} (ppm): 167,11, 148,33, 147,47, 146,41, 145,30, 131,19, 129,57, 127,24, 125,30, 125,14, 124,32, 122,63, 122,04, 121,98, 121,50, 109,18, 74,58, 63,69, 56,14, 55,96, 55,37, 54,79, 54,69, 54,62, 43,11, 27,65, 27,05, 26,50, 26,15, 26,02, 25,94, 24,59, 24,51, 24,46. IV (KBr, cm^{-1}): 3423 (NH ou COO-H *st.*), 1710 (CO). Análise elementar (C, H, N, S): Calculado ($\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 3\text{HCl} + 8,1\text{H}_2\text{O} + 0,02\text{DMSO}$): C 52,80%, H 8,24%, N 7,69%, S 0,04%; Encontrado: C 52,83%, H 6,82%, N 7,67%, S 0,02%.

5.5.9. 5,10-BIS(3-MORFOLINOPROPIL)-11-OXO-INDOLO[3,2-*B*]QUINOLINA-7-CARBOXILATO DE 3-MORFOLINOPROPILO (**9**)



O composto **9** foi sintetizado de acordo com o **Procedimento geral E**, partindo de 70,4 mg de **32** e usando hidrocloreto de 4-(3-cloropropil)morfolina. A reacção demorou 22 horas. Foi realizada uma purificação primária, por PTLC, tendo como eluente AcOEt e dando origem a duas manchas. Cada mancha foi desadsorvida duas vezes da alumina com recurso a uma solução de DCM : acetona (9:1). A composição quantitativa das duas manchas encontra-se descrita na **Tabela 26**.

Tabela 26: Manchas obtidas após PTLC primária do composto **9**.

R_F	Produto (mg)
0,1	9,7
0,3	5,7

A análise por ^1H RMN mostrou que ambas as manchas continham mistura, pelo que se juntaram para fazer nova preparativa, com o mesmo eluente (**Tabela 27**), efectuando-se duas corridas. A desadsorção foi feita recorrendo a uma solução de DCM : MeOH (9:1).

Tabela 27: Manchas obtidas após segunda PTLC primária do composto **9**.

R _F	Produto (mg)
0,3	8,2
0,4	5,6

Por TLC, verificou-se a existência de várias manchas em cada um e predominância da concentração na mancha a R_F 0,3, pelo que esta foi aplicada em nova PTLC secundária, com quatro corridas e eluente de AcOEt : hexano (9,5:0,5) (**Tabela 28**).

Tabela 28: Manchas obtidas após PTLC secundária do composto **9**.

R _F	Produto (mg)
0,5	3,7
0,7	3,9

Por ¹H RMN, verificou-se que a fracção a R_F 0,5 continha o composto **17** (3,7 mg, 2,2%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 8,91 (s, 1H), 8,66 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,73 (dd, *J* = 8,6, 7,6 Hz, 1H), 7,67 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,39 (dd, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,01 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 4,92 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 4,46 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,75 (m, 16H), 2,52 (m, 8H), 2,28 (m, 2H), 2,18 (m, 2H), 2,04 (m, 2H).

5.6. ENSAIOS DE ESTABILIZAÇÃO DE G-QUADRUPLÉXOS EFECTUADOS POR DESNATURAÇÃO TÉRMICA

A capacidade das indolo[3,2-*b*]quinolinas de estabilizar as sequências de G-quadruplexos de ADN foi averiguada através de ensaios de FRET. Os oligonucleótidos marcados (Eurogentec Ltd., UK) tinham acoplado o fluoróforo dador FAM (6-carboxifluoresceína) e o fluoróforo aceitador TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina): F21T (5'-FAM-GGGTTAGGG TAGGGTTAGGG-TAMRA-3'); *HSP90A* (5'-FAM-GGGCC-AAAGGGAAGGGGTGGG-TAMRA-3'); *Kras21R* (5''-FAM-AGGGCGG TGTGGGAAGAGGGA-TAMRA-3'); T-Loop (5'-FAM-TATAGCTATATTTTTTTA TAGCTATA-TAMRA-3'). Cada oligonucleótido foi diluído inicialmente em água livre

de nucleases (Amblion Applied Biosystems UK) à concentração de 100 mM. A solução *stock* de 20 mM e as diluições subsequentes foram obtidas em tampão de FRET (60 mM KCl, cacodilato de potássio, pH 7.4). As sequências foram diluídas a partir da solução *stock* até à concentração desejada (0.4 mM), sendo depois feito o *annealing* por aquecimento a 85°C por 10 minutos, e arrefecimento posterior à temperatura ambiente. Os compostos a testar foram preparados como soluções stock 10 mM em DMSO e diluídas até 1 mM através do uso de 1 mM HCl em água de qualidade para HPLC. As restantes diluições foram efectuadas recorrendo ao tampão de FRET. O ADN preparado (50 µL) e as soluções dos compostos a testar (50 µL) foram distribuídos por placas de RT-PCR de 96 poços (BioRad; MJ Research, Waltham, MA, USA). De modo a verificar se havia interferência no ensaio, foram também aplicados os controlos relevantes. As leituras de fluorescência foram efectuadas com excitação entre os 450 e os 495 nm e detecção entre os 515 e os 545 nm. As leituras foram registadas com intervalos de 0.5°C entre os 30 e os 100°C, mantendo-se a temperatura constante por 30s antes da leitura, de modo a garantir valores estáveis. A temperatura de fusão do G-quadruplexo F21T (0.2 µM) foi também monitorizada num ensaio de competição na presença de 0.4, 2.0, 10 e 25 µM de um competidor de dupla cadeia não-fluorescente (ds26 (5'-CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG-3')), a uma concentração de ligando de 1 µM. Cada experiência foi efectuada em triplicado. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). A função avançada de *curve-fitting* do GraphPad Prism foi utilizada para o cálculo dos valores de ΔT_m e desvios-padrão associados. Este protocolo foi levado a cabo pelo Dr. João Lavrado nas instalações da School of Pharmacy, University College London.

5.7. DOCKING MOLECULAR

Estruturas utilizadas: As estruturas teloméricas (códigos PDB 143D, 1KF1 e 2JPZ) utilizadas foram as preparadas por Lavrado, *et. al.* (2013) (54).

Docking molecular: Os ficheiros PDB das estruturas das indolo[3,2-*b*]quinolinas a testar foram construídos com a funcionalidade Builder do MOE 2009.10 (89) e a sua energia foi minimizada com recurso ao campo de forças MMFF94x. Após protonação a pH 7 (ou 12, para os ligandos **5**, **6** e **9**), com temperatura de 300K e concentração de sal de 0.1 mol/dm³, foi efectuado o *docking* molecular em cada um dos receptores, usando as funções Alpha HB (parâmetros variáveis) ou London dG para o *scoring* inicial e Triangle Matcher como método de posicionamento. O refinamento foi feito usando como método o campo de forças MMFF94x e uma das duas funções de *scoring* acima descritas. A tétrede de guaninas superior foi eleita como sítio preferencial de posicionamento em todos os casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Schmid, J. A.; Sitte, H. H. Fluorescence resonance energy transfer in the study of cancer pathways. *Curr. Opin. Oncol.* **2003**, *15*, 55–64.
- (2) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- (3) Peto, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* **2001**, *411*, 390–395.
- (4) Neidle, S. The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 239–50.
- (5) Lipps, H. J.; Rhodes, D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 414–22.
- (6) Olsen, C. M.; Gmeiner, W. H.; Marky, L. a Unfolding of G-quadruplexes: energetic, and ion and water contributions of G-quartet stacking. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 6962–9.
- (7) Tang, J.; Kan, Z.-Y.; Yao, Y.; Wang, Q.; Hao, Y.-H.; Tan, Z. G-quadruplex preferentially forms at the very 3' end of vertebrate telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1200–8.
- (8) Franceschin, M. G-Quadruplex DNA Structures and Organic Chemistry: More Than One Connection. *European J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 2225–2238.
- (9) Guyen, B.; Schultes, C. M.; Hazel, P.; Mann, J.; Neidle, S. Synthesis and evaluation of analogues of 10H-indolo[3,2-b]quinoline as G-quadruplex stabilising ligands and potential inhibitors of the enzyme telomerase. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 981–8.
- (10) Bray, F.; Jemal, A.; Grey, N.; Ferlay, J.; Forman, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 790–801.
- (11) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- (12) Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 220–8.
- (13) Neckers, L. Chaperoning Oncogenes: Hsp90 as a Target of Geldanamycin. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, *172*, 259–277.
- (14) Weinstein, I. B. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* (80-.). **2002**, *297*, 63–4.
- (15) Weinstein, I. B.; Joe, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2006**, *3*, 448–57.

- (16) Zimmermann, S.; Martens, U. M. Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 906–21.
- (17) Rezler, E. M.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 415–23.
- (18) Boukamp, P.; Mirancea, N. Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy? *Exp. Dermatol.* **2007**, *16*, 71–9.
- (19) Oganessian, L.; Karlseder, J. Telomeric armor: the layers of end protection. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 4013–25.
- (20) Fajkus, J.; Simicková, M.; Maláská, J. Tiptoeing to chromosome tips: facts, promises and perils of today's human telomere biology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2002**, *357*, 545–62.
- (21) Helder, M. N.; Wisman, G. B. A.; van der Zee, G. J. Telomerase and telomeres: from basic biology to cancer treatment. *Cancer Invest.* **2002**, *20*, 82–101.
- (22) Mondello, C.; Scovassi, A. I. Telomeres , telomerase , and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82*, 498–507.
- (23) Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–49.
- (24) Huppert, J. L. Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *FEBS J.* **2010**, *277*, 3452–8.
- (25) Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renciuk, D.; Vorlícková, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713–25.
- (26) Doluca, O.; Withers, J. M.; Filichev, V. V Molecular Engineering of Guanine-Rich Sequences : Z-DNA, DNA Triplexes , and G-Quadruplexes. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3044–3083.
- (27) Minsky, A. Information Content and Complexity in the High-Order Organization of Dna. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 317–342.
- (28) Brzezinski, K.; Brzuszkiewicz, A.; Dauter, M.; Kubicki, M.; Jaskolski, M.; Dauter, Z. High regularity of Z-DNA revealed by ultra high-resolution crystal structure at 0.55 Å. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 6238–6248.
- (29) Verdaguer, N.; Aymami, J.; Fernández-Fórner, D.; Fita, I.; Coll, M.; Huynh-Dinh, T.; Igolen, J.; Subirana, J. A. Molecular structure of a complete turn of A-DNA. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 623–635.
- (30) Drew, H. R.; Wing, R. M.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. Structure of a B-DNA dodecamer: Conformation and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 2179–2183.

- (31) Gilbert, D. E.; Feigon, J. Multistranded DNA structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 305–14.
- (32) Guéron, M.; Leroy, J. L. The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 326–331.
- (33) Murat, P.; Singh, Y.; Defrancq, E. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293.
- (34) Adrian, M.; Heddi, B.; Phan, A. T. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods* **2012**, *57*, 11–24.
- (35) Ghosal, G.; Muniyappa, K. Hoogsteen base-pairing revisited: Resolving a role in normal biological processes and human diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343*, 1–7.
- (36) Clay, E. H.; Gould, I. R. A combined QM and MM investigation into guanine quadruplexes. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *24*, 138–46.
- (37) Huppert, J. L. Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *FEBS J.* **2010**, *277*, 3452–8.
- (38) Xu, Y.; Noguchi, Y.; Sugiyama, H. The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5584–91.
- (39) Zhang, Z.; Dai, J.; Veliath, E.; Jones, R. A.; Yang, D. Structure of a two-G-tetrad intramolecular G-quadruplex formed by a variant human telomeric sequence in K⁺ solution: insights into the interconversion of human telomeric G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1009–21.
- (40) Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. a; Yang, D. Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4927–40.
- (41) Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **2007**, *43*, 324–31.
- (42) Mita, H.; Kato, Y.; Ozawa, M.; Fujisaki, T.; Yamamoto, Y. Effects of various cations on the dynamic and thermodynamics of the dimerization of G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, 191–2.
- (43) Burge, S.; Parkinson, G. N.; Hazel, P.; Todd, A. K.; Neidle, S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–15.
- (44) Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417*, 876–880.

- (45) Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D. Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4927–40.
- (46) Bryan, T. M.; Baumann, P. G-quadruplexes: from guanine gels to chemotherapeutics. *Mol. Biotechnol.* **2011**, *49*, 198–208.
- (47) Biffi, G.; Tannahill, D.; McCafferty, J.; Balasubramanian, S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182–186.
- (48) Neidle, S.; Read, M. G-quadruplexes as therapeutic targets. *Biopolymers* **2001**, *56*, 195–208.
- (49) Cogoi, S.; Xodo, L. E. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2536–49.
- (50) Goetz, M. P. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 1169–1176.
- (51) Whitesell, L.; Lindquist, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761–72.
- (52) Tan, J.-H.; Gu, L.-Q.; Wu, J.-Y. Design of selective G-quadruplex ligands as potential anticancer agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1163–78.
- (53) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627–36.
- (54) Lavrado, J.; Borralho, P. M.; Ohnmacht, S. A.; Castro, R. E.; Rodrigues, C. M. P.; Moreira, R.; Santos, D. J. V. A. dos; Neidle, S.; Paulo, A. Synthesis, G-Quadruplex Stabilisation, Docking Studies, and Effect on Cancer Cells of Indolo[3,2-b]quinolines with One, Two, or Three Basic Side Chains. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1648–1661.
- (55) Caprio, V.; Guyen, B.; Opoku-Boahen, Y.; Mann, J.; Gowan, S. M.; Kelland, L. M.; Read, M. A.; Neidle, S. A Novel Inhibitor of Human Telomerase Derived from 10H-Indolo [3, 2- b] quinoline. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2063–2066.
- (56) Lavrado, J.; Moreira, R.; Paulo, A. Indoloquinolines as Scaffolds for Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2348–2370.
- (57) Michael, J. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *14*, 605–618.

- (58) Lisgarten, J. N.; Coll, M.; Portugal, J.; Wright, C. W.; Aymami, J. The antimalarial and cytotoxic drug cryptolepine intercalates into DNA at cytosine-cytosine sites. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 57–60.
- (59) Guittat, L.; Alberti, P.; Rosu, F.; Van Miert, S.; Thetiot, E.; Pieters, L.; Gabelica, V.; De Pauw, E.; Ottaviani, A.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L. Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. *Biochimie* **2003**, *85*, 535–547.
- (60) Guyen, B.; Schultes, C. M.; Hazel, P.; Mann, J.; Neidle, S. Synthesis and evaluation of analogues of 10H-indolo[3,2-b]quinoline as G-quadruplex stabilising ligands and potential inhibitors of the enzyme telomerase. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 981–8.
- (61) Zhou, J.-L.; Lu, Y.-J.; Ou, T.-M.; Zhou, J.-M.; Huang, Z.-S.; Zhu, X.-F.; Du, C.-J.; Bu, X.-Z.; Ma, L.; Gu, L.-Q.; Li, Y.-M.; Chan, A. S.-C. Synthesis and evaluation of quindoline derivatives as G-quadruplex inducing and stabilizing ligands and potential inhibitors of telomerase. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7315–21.
- (62) Ou, T.-M.; Lu, Y.-J.; Zhang, C.; Huang, Z.-S.; Wang, X.-D.; Tan, J.-H.; Chen, Y.; Ma, D.-L.; Wong, K.-Y.; Tang, J. C.-O.; Chan, A. S.-C.; Gu, L.-Q. Stabilization of G-quadruplex DNA and down-regulation of oncogene c-myc by quindoline derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1465–74.
- (63) Lavrado, J.; Reszka, A. P.; Moreira, R.; Neidle, S.; Paulo, A. C-11 diamino cryptolepine derivatives NSC748392, NSC748393, and NSC748394: anticancer profile and G-quadruplex stabilization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7042–5.
- (64) Zhou, J.; Zhu, X.; Lu, Y.; Deng, R.; Huang, Z.; Mei, Y.-P.; Wang, Y.; Huang, W.-L.; Liu, Z.-C.; Gu, L.-Q.; Zeng, Y. Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. *Oncogene* **2006**, *25*, 503–11.
- (65) Ou, T.-M.; Lin, J.; Lu, Y.-J.; Hou, J.-Q.; Tan, J.-H.; Chen, S.-H.; Li, Z.; Li, Y.-P.; Li, D.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S. Inhibition of cell proliferation by quindoline derivative (SYUIQ-05) through its preferential interaction with c-myc promoter G-quadruplex. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5671–9.
- (66) Lu, Y.-J.; Ou, T.-M.; Tan, J.-H.; Hou, J.-Q.; Shao, W.-Y.; Peng, D.; Sun, N.; Wang, X.-D.; Wu, W.-B.; Bu, X.-Z.; Huang, Z.-S.; Ma, D.-L.; Wong, K.-Y.; Gu, L.-Q. 5-N-methylated quindoline derivatives as telomeric g-quadruplex stabilizing ligands: effects of 5-N positive charge on quadruplex binding affinity and cell proliferation. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6381–92.
- (67) Lavrado, J.; Moreira, R.; Paulo, A. Synthetic strategies towards bioactive indolo [3,2-b] quinolines. In *Heterocyclic Targets in Advanced Organic Synthesis*; Carreiras, M. C.; Marco-Contelles, J., Eds.; Research Signpost, 2011; Vol. 661, pp. 109–124.

- (68) Parvatkar, P. T.; Parameswaran, P. S.; Tilve, S. G. Isolation, Biological Activities and Synthesis of Indoloquinoline Alkaloids: Cryptolepine, Isocryptolepine and Neocryptolepine. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 1036–57.
- (69) Lavrado, J.; Borralho, P. M.; Ohnmacht, S. a; Castro, R. E.; Rodrigues, C. M. P.; Moreira, R.; Santos, D. J. V. a Dos; Neidle, S.; Paulo, A. Synthesis, G-Quadruplex Stabilisation, Docking Studies, and Effect on Cancer Cells of Indolo[3,2-b]quinolines with One, Two, or Three Basic Side Chains. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1648–1661.
- (70) Han, H.; Hurley, L. H. G-quadruplex DNA : a potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 136–142.
- (71) Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113–2116.
- (72) Harrison, R. J.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Neidle, S. Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2463–8.
- (73) Redman, J. E.; Granadino-Roldán, J. M.; Schouten, J. A.; Ladame, S.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Balasubramanian, S. Recognition and discrimination of DNA quadruplexes by acridine-peptide conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 76–84.
- (74) Jain, A. K.; Bhattacharya, S. Interaction of G-quadruplexes with nonintercalating duplex-DNA minor groove binding ligands. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 2355–68.
- (75) Peng, D.; Tan, J.-H.; Chen, S.-B.; Ou, T.-M.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S. Bisaryldiketene derivatives: A new class of selective ligands for c-myc G-quadruplex DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8235–42.
- (76) Paul, A.; Maji, B.; Misra, S. K.; Jain, A. K.; Muniyappa, K.; Bhattacharya, S. Stabilization and structural alteration of the G-quadruplex DNA made from the human telomeric repeat mediated by Tröger's base based novel benzimidazole derivatives. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7460–71.
- (77) Bhattacharya, S.; Chaudhuri, P.; Jain, A. K.; Paul, A. Symmetrical bisbenzimidazoles with benzenediyl spacer: the role of the shape of the ligand on the stabilization and structural alterations in telomeric G-quadruplex DNA and telomerase inhibition. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1148–59.
- (78) Monchaud, D.; Granzhan, A.; Saettel, N.; Guédin, A.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P. "One ring to bind them all"-part I: the efficiency of the macrocyclic scaffold for g-quadruplex DNA recognition. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2010*.

- (79) Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1262–3.
- (80) Lavrado, J. Novel C11 Amino Derivatives of Cryptolepine Synthesis and in vitro studies with DNA and haeme. Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, **2010**.
- (81) Alemán, P.; Boix, C.; Poliakoff, M. Hydrolysis and saponification of methyl benzoates. *Green Chem.* **1999**, 65–68.
- (82) McBee, E. T.; Frost, L. W.; Frederick, M. R.; Pierce, O. R. Reactivity of Perfluoroalkyl Groups and of Halogen in (Perfluoroalkyl) Halobenzenes. *Proc. Indiana Acad. Sci.* **1959**, *69*, 143–147.
- (83) Kobayashi, Y.; Kumadaki, I. Reactions of aromatic trifluoromethyl compounds with nucleophilic reagents. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 197–204.
- (84) Wan, S. B.; Liu, Z. L.; Chen, D.; Dou, Q. P.; Jiang, T. Polyphosphorous acid catalyzed cyclization in the synthesis of cryptolepine derivatives. *Chinese Chem. Lett.* **2007**, *18*, 1179–1181.
- (85) Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A. A Rigorous Test for SPARC's Chemical Reactivity Models: Estimation of More Than 4300 Ionization pKa's. *Quant. Struct. Relationships* **1995**, *14*, 348–55.
- (86) De Cian, A.; Mergny, J.-L. Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2483–93.
- (87) Ma, D.-L.; Ma, V. P.-Y.; Chan, D. S.-H.; Leung, K.-H.; Zhong, H.-J.; Leung, C.-H. In silico screening of quadruplex-binding ligands. *Methods* **2012**, *57*, 106–14.
- (88) Wang, Y.; Patel, D. J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure* **1993**, *4*, 263–82.
- (89) Molecular Operating Environment (MOE), 2009.10, Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 **2009**.
- (90) Yang, D.; Okamoto, K. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 619–46.
- (91) Huppert, J. L. Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1375–84.
- (92) Nagatoishi, S.; Nojima, T.; Juskowiak, B.; Takenaka, S. A Pyrene-Labeled G-Quadruplex Oligonucleotide as a Fluorescent Probe for Potassium Ion Detection in Biological Applications. *Angew. Chemie* **2005**, *117*, 5195–5198.

ANEXOS

ANEXO I: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY) E IV DO COMPOSTO **27**

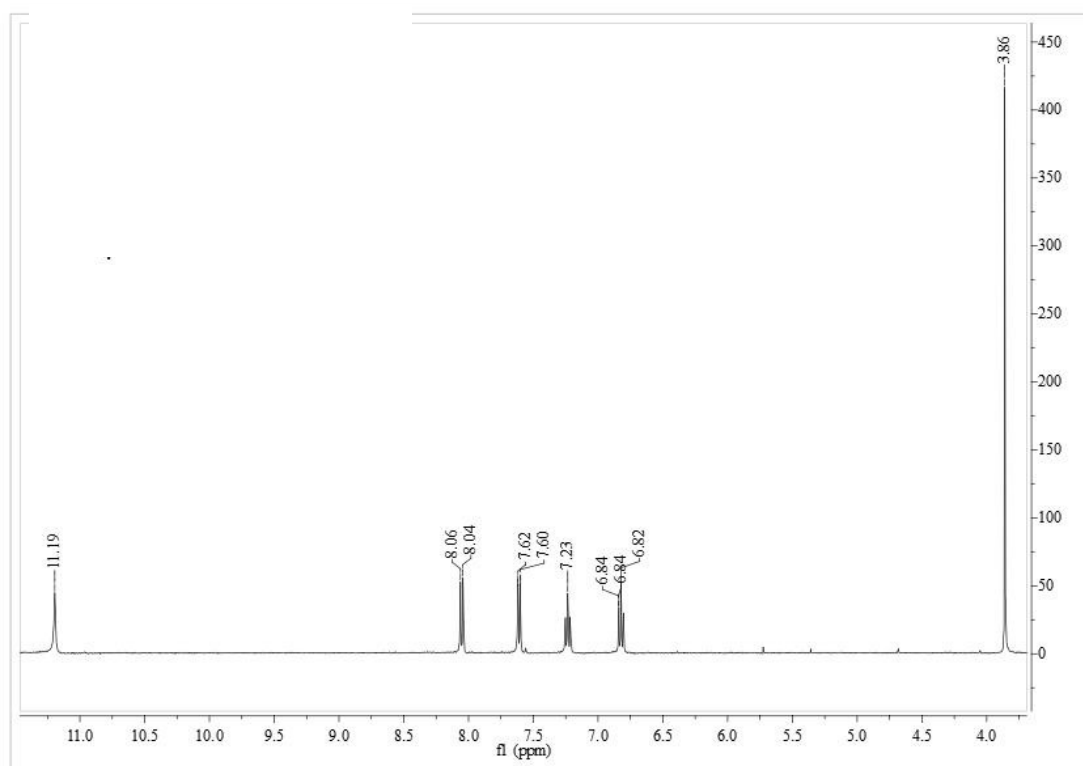


Figura 30: Reprodução parcial do espectro de ^1H RMN do composto **27**, traçado em DMSO.

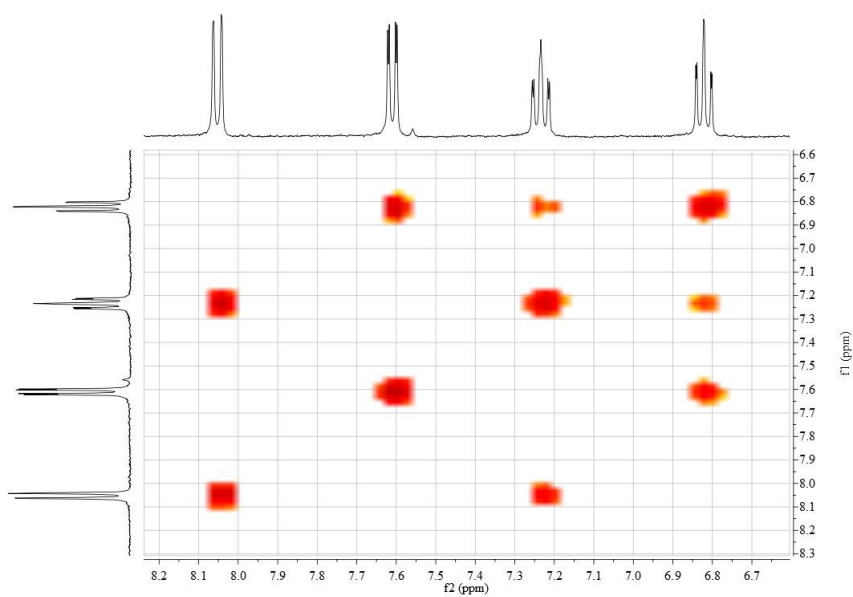


Figura 31: Reprodução parcial do espectro de COSY do composto **27**, traçado em DMSO.

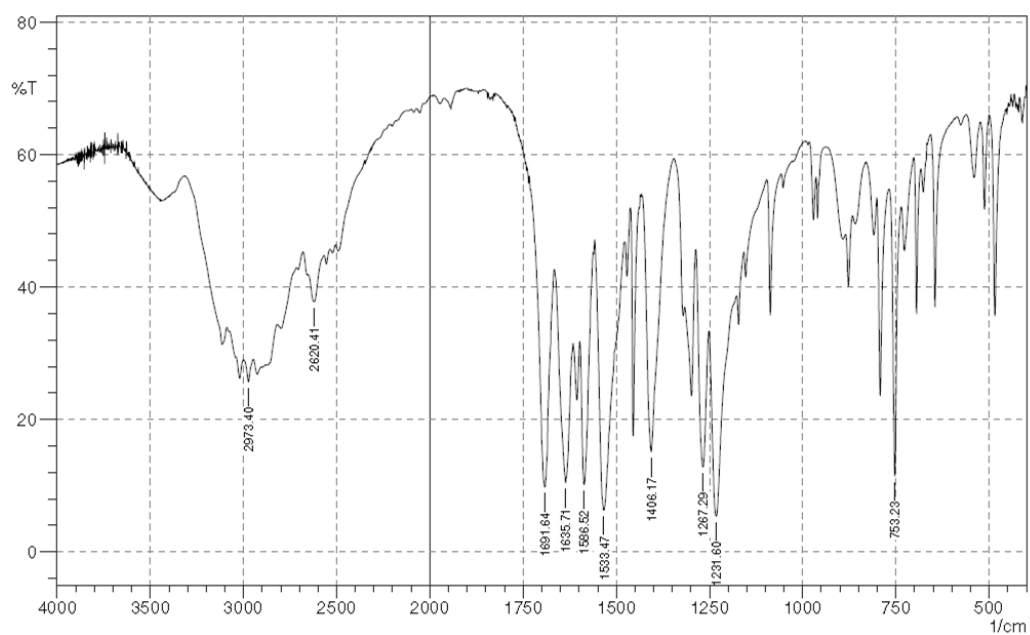


Figura 32: Espectro de IV do composto **27**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO II: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY) E IV DO COMPOSTO **30**

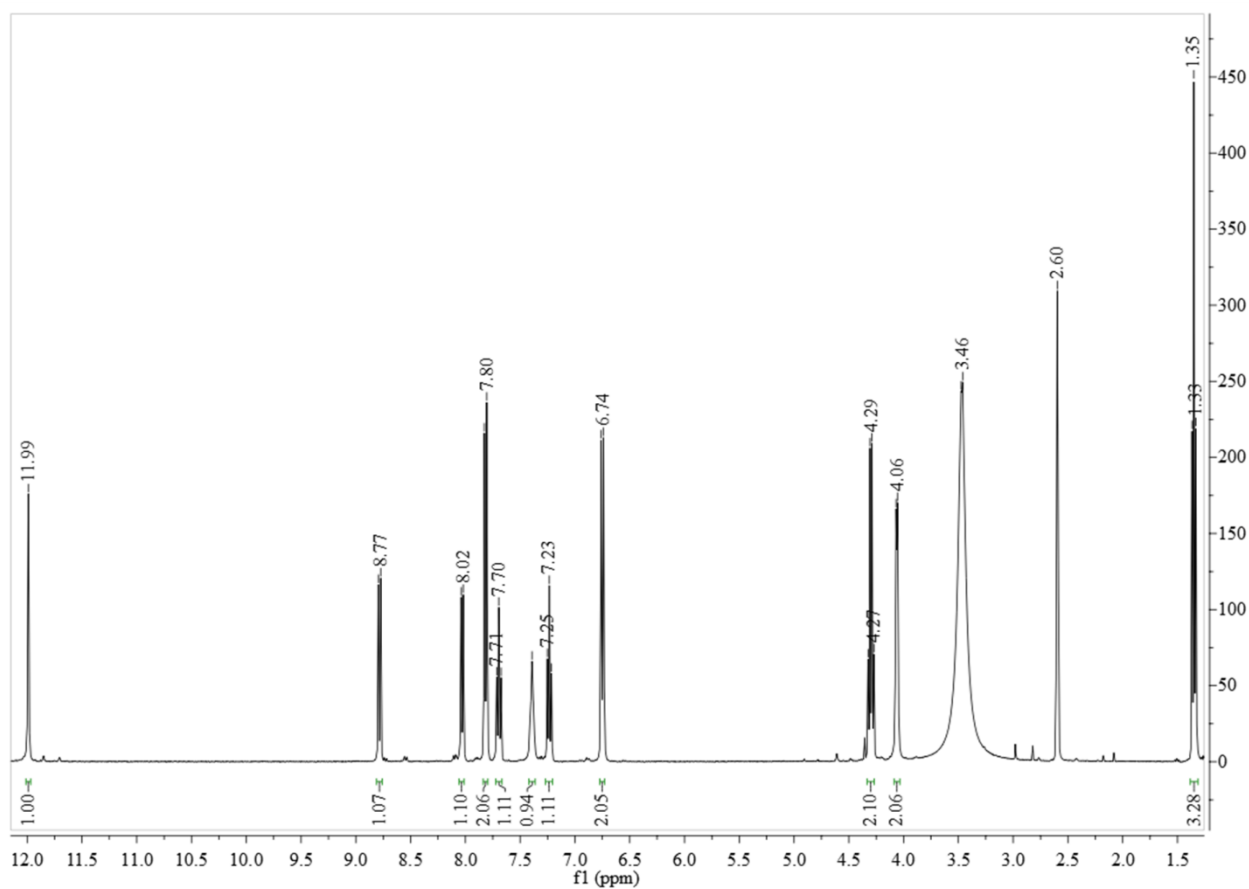


Figura 33: Reprodução parcial do espectro de ^1H RMN do composto **30**, traçado em DMSO.

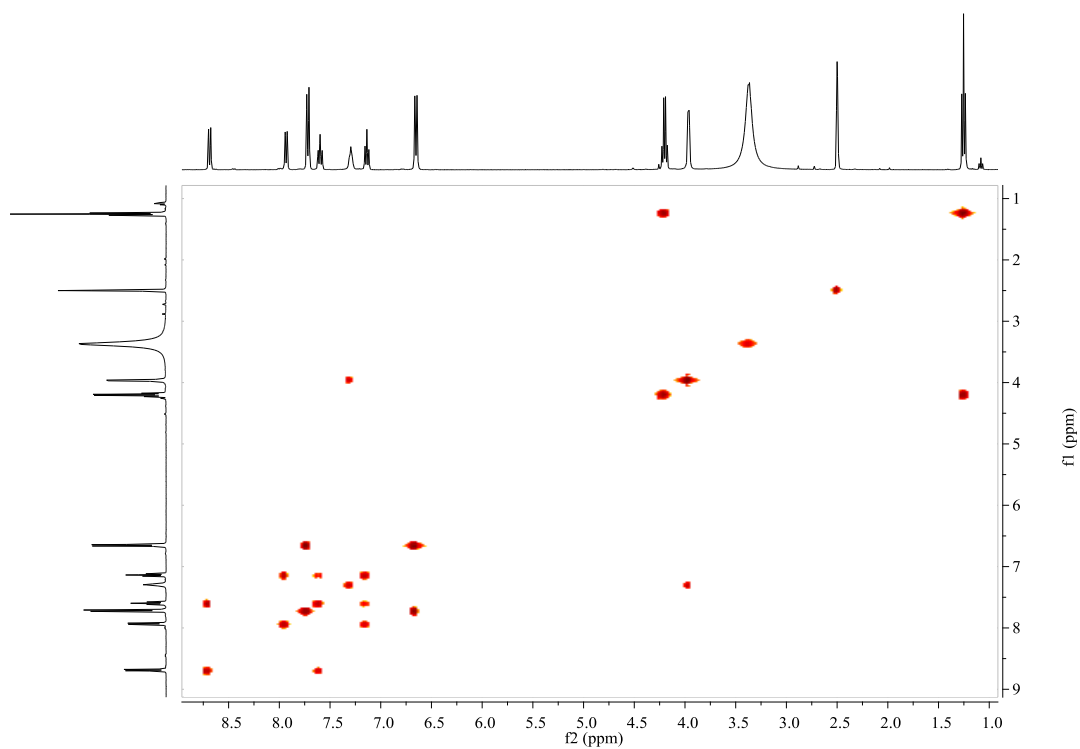


Figura 34: Espectro de COSY do composto **30**, traçado em DMSO.

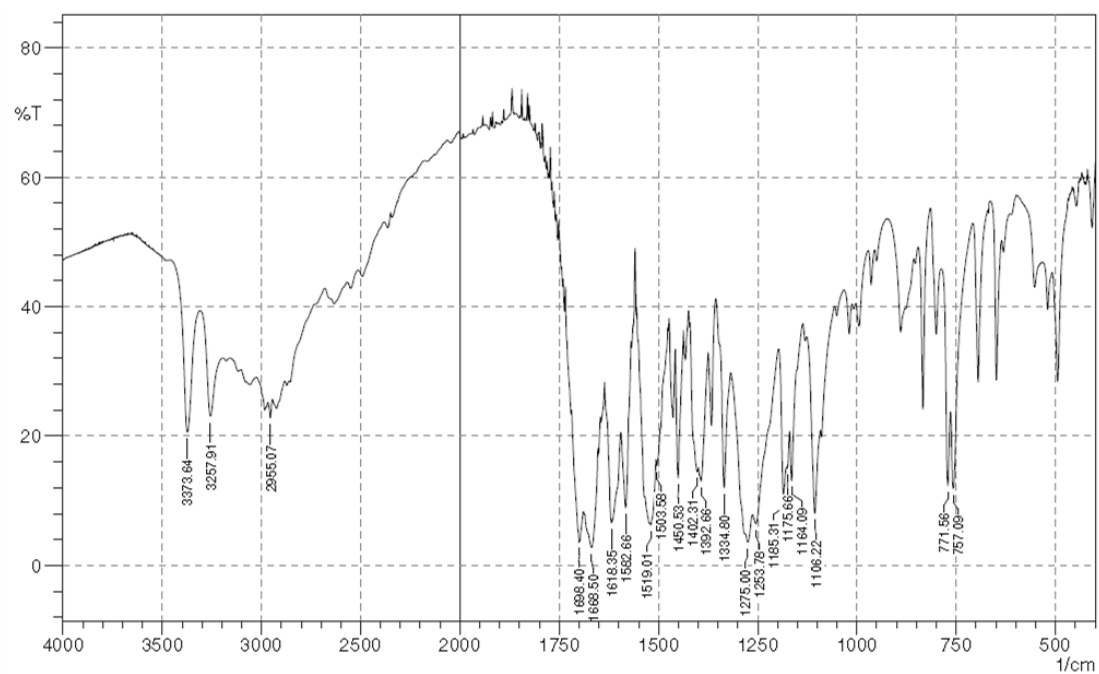


Figura 35: Espectro de IV do composto **30**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO III: ESPECTROS DE ^1H RMN E COSY DO COMPOSTO **31**

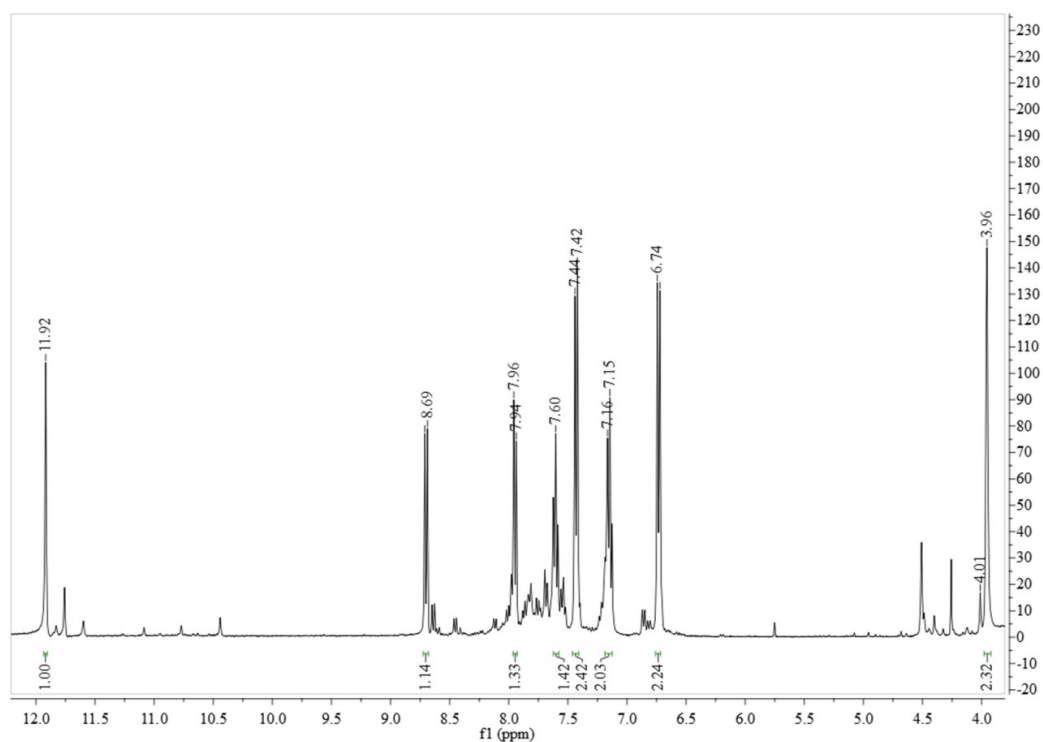


Figura 36: Espectro de ^1H RMN do composto **31** impuro, traçado em DMSO.

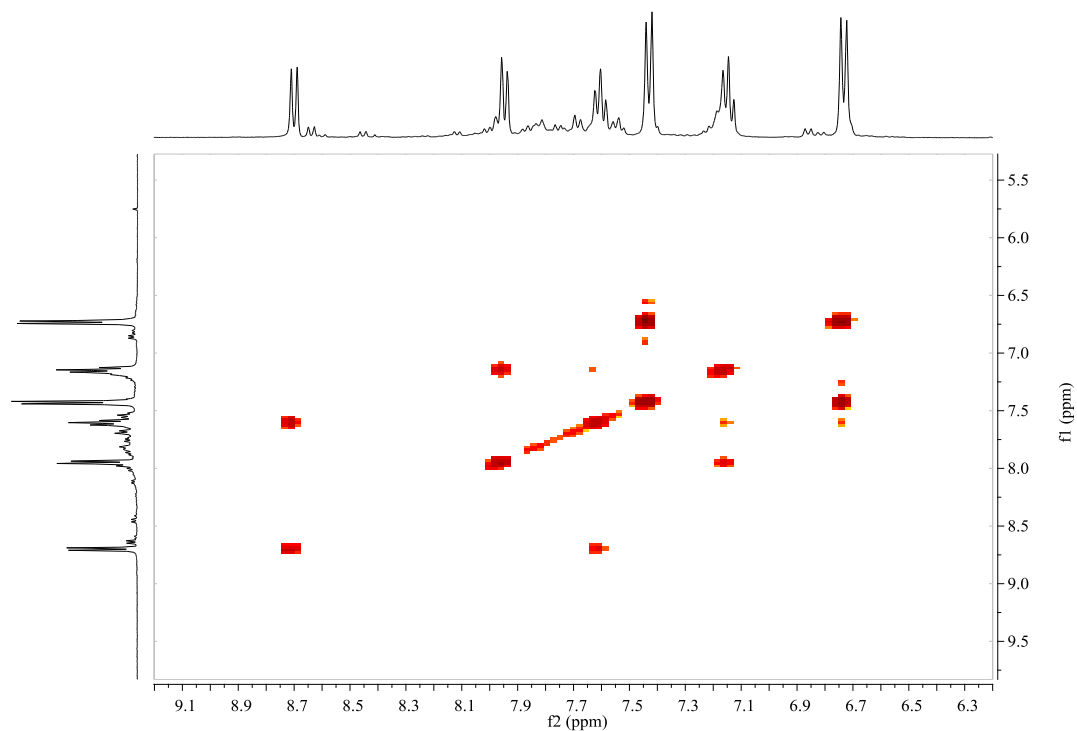


Figura 37: Espectro de COSY do composto **31**, traçado em DMSO.

ANEXO IV: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC E HMBC) E IV DO COMPOSTO **32**

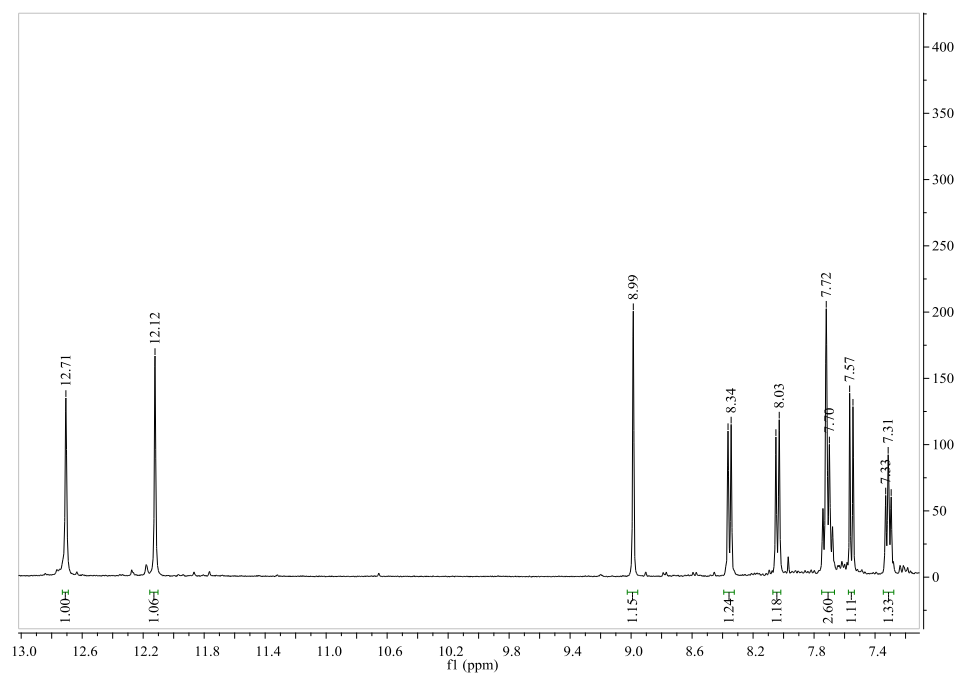


Figura 38: Reprodução parcial do espectro de ^1H RMN do composto **32**, obtido em DMSO.

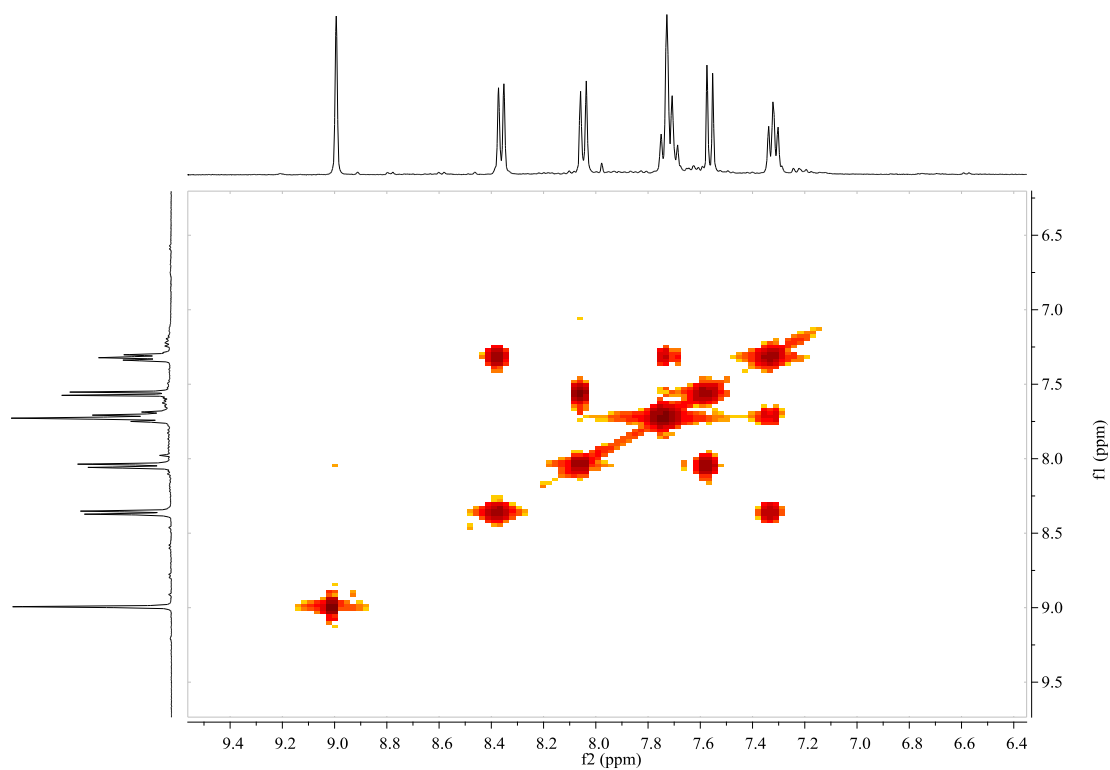


Figura 39: Espectro de COSY do composto **32**, obtido em DMSO.

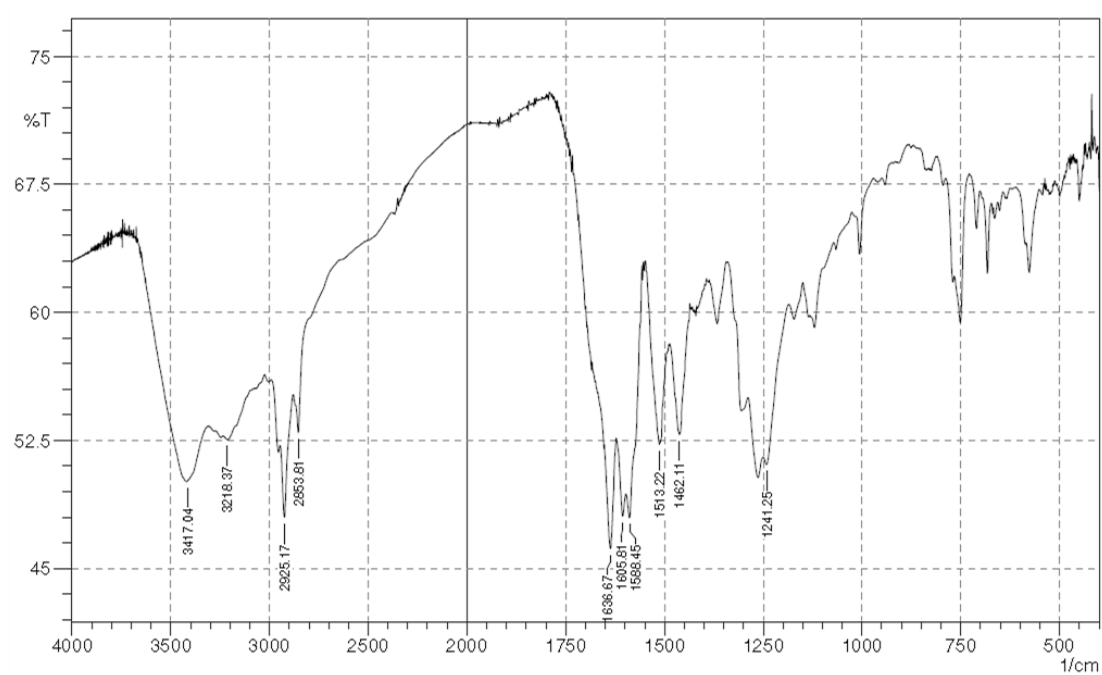


Figura 40: Espectro de IV do composto **32**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO V: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC, HMBC) E IV DO COMPOSTO **1**

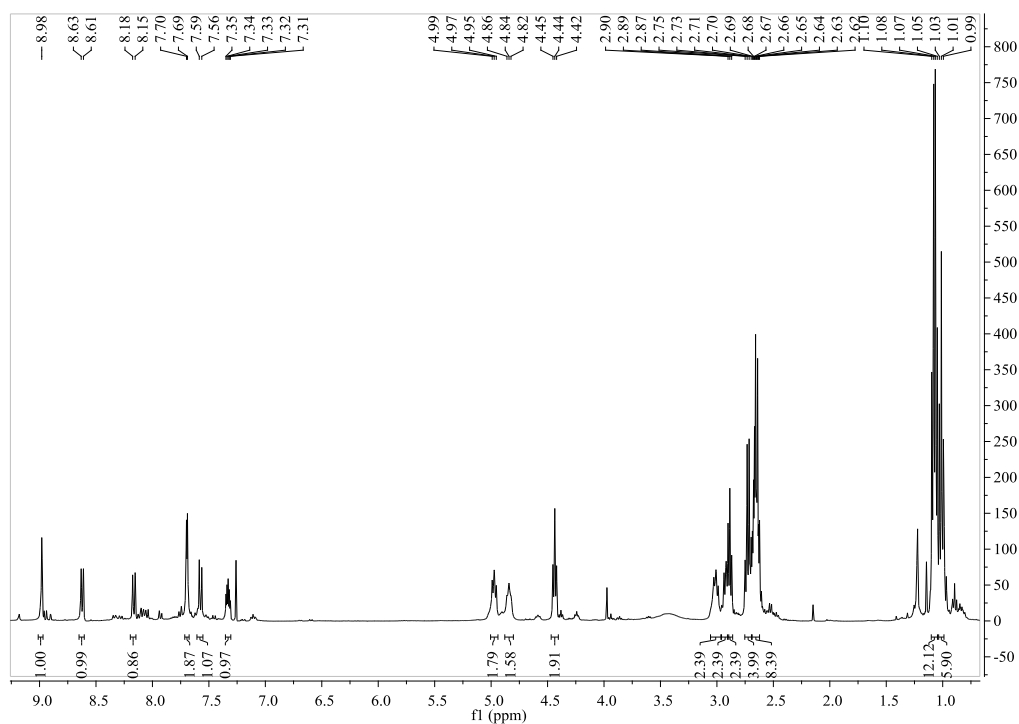


Figura 41: Espectro de ^1H RMN do composto **1**, traçado em CDCl_3 .

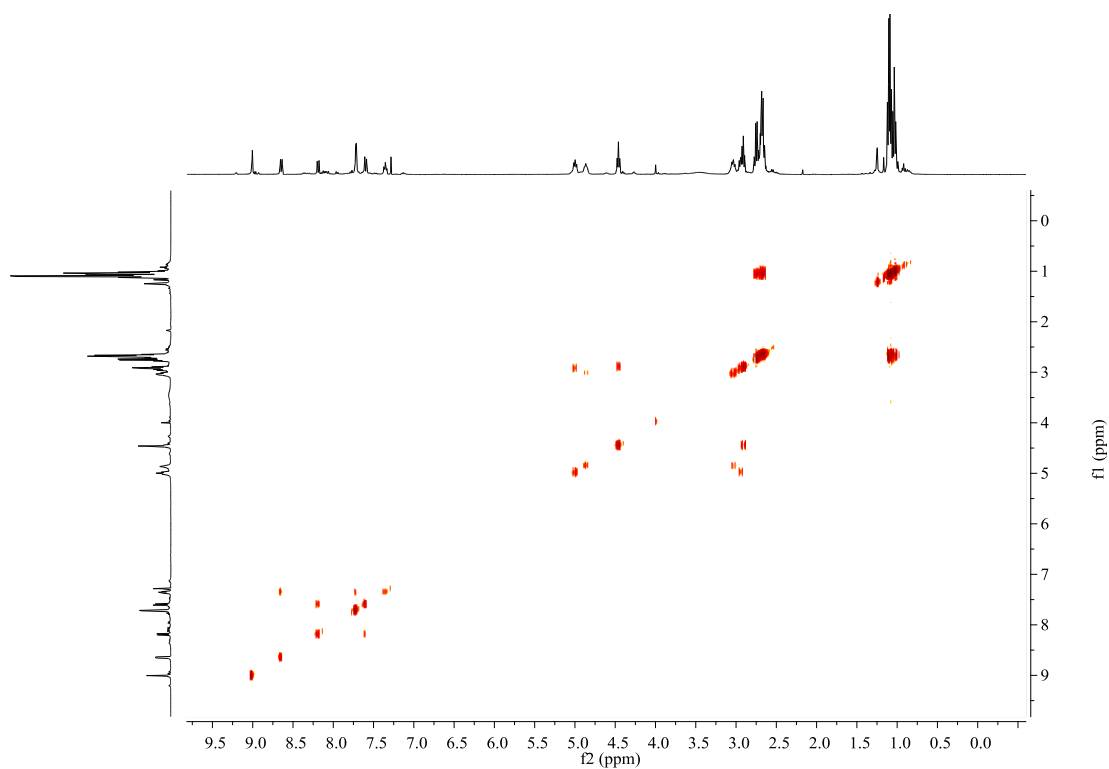


Figura 42: Espectro de COSY do composto **1**, traçado em CDCl_3 .

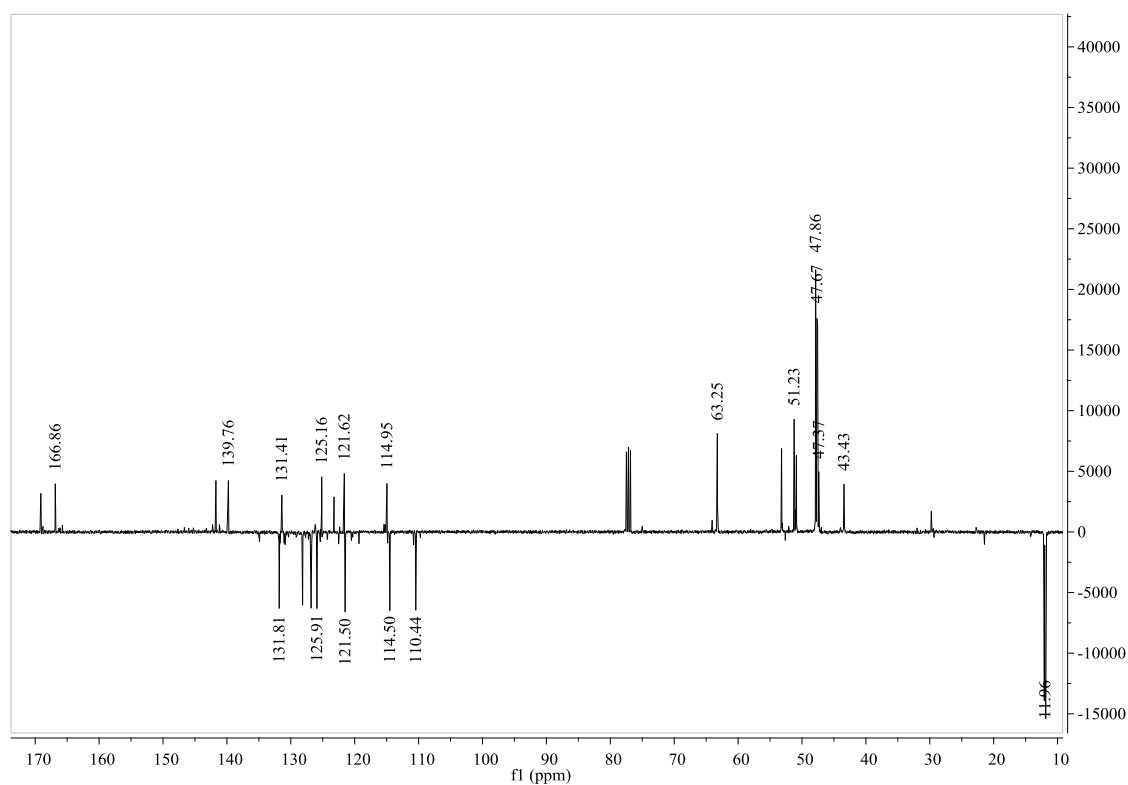


Figura 43: Espectro de ^{13}C RMN do composto **1**, traçado em CDCl₃.

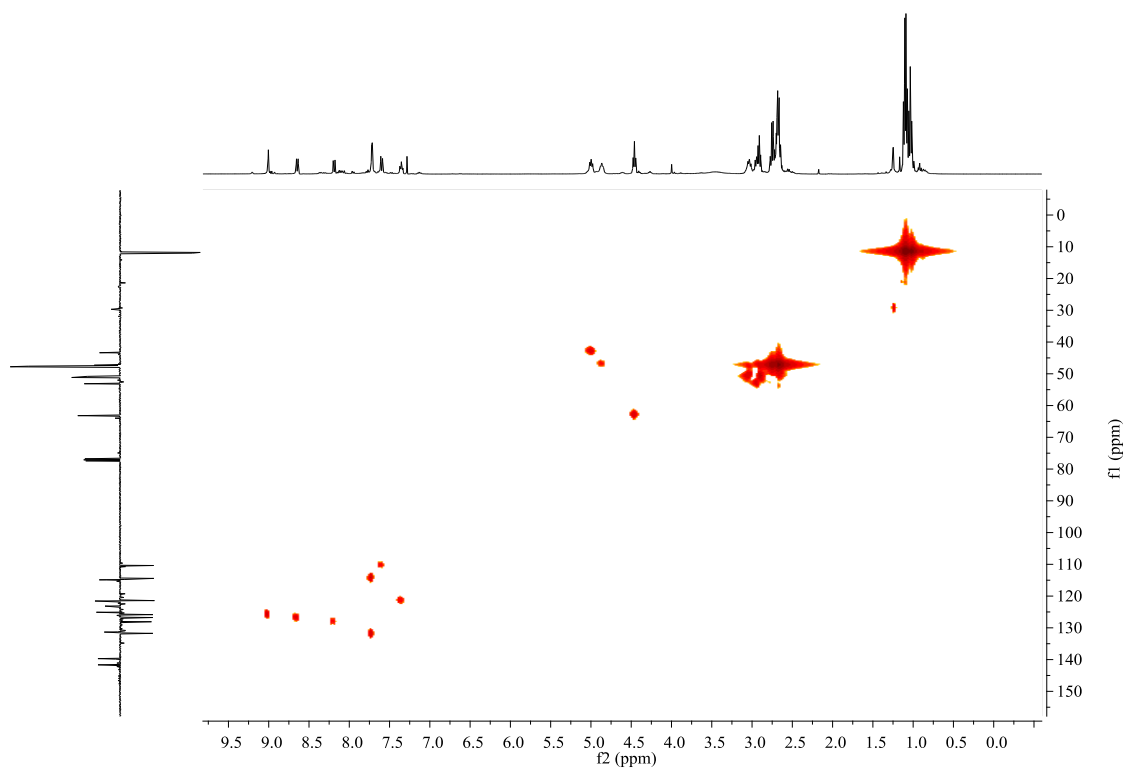


Figura 44: Espectro de HMQC do composto **1**, traçado em CDCl₃.

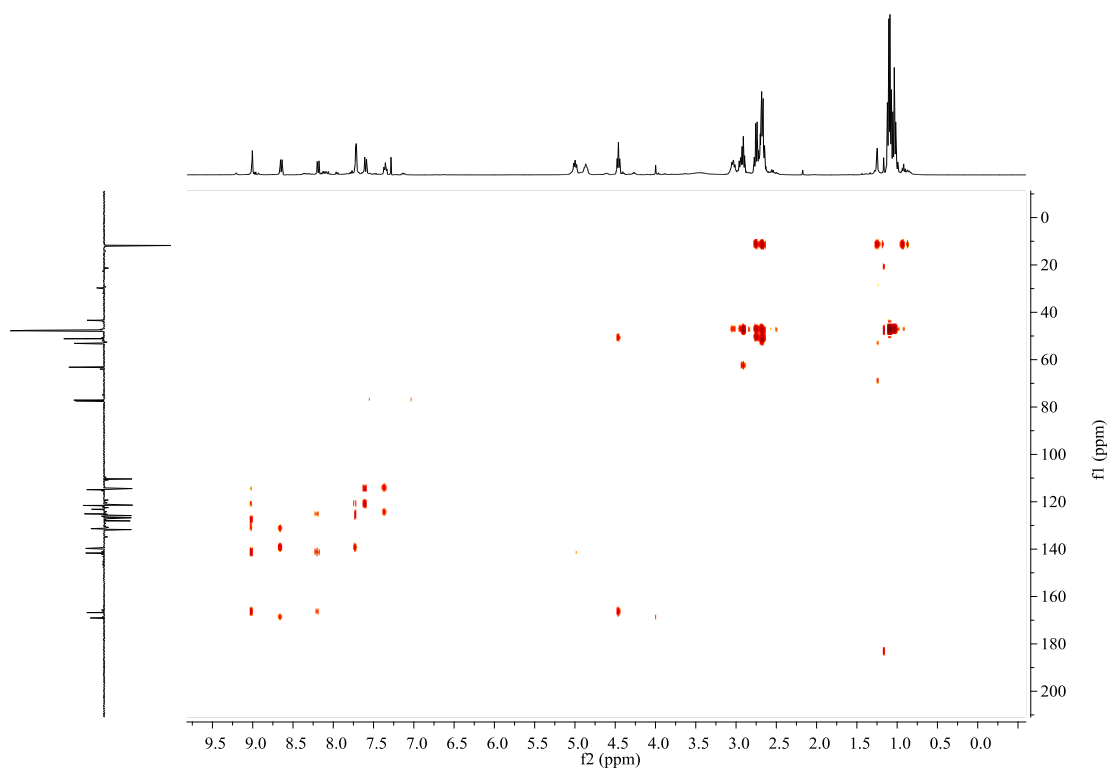


Figura 45: Espectro de HMBC do composto **1**, traçado em CDCl_3 .

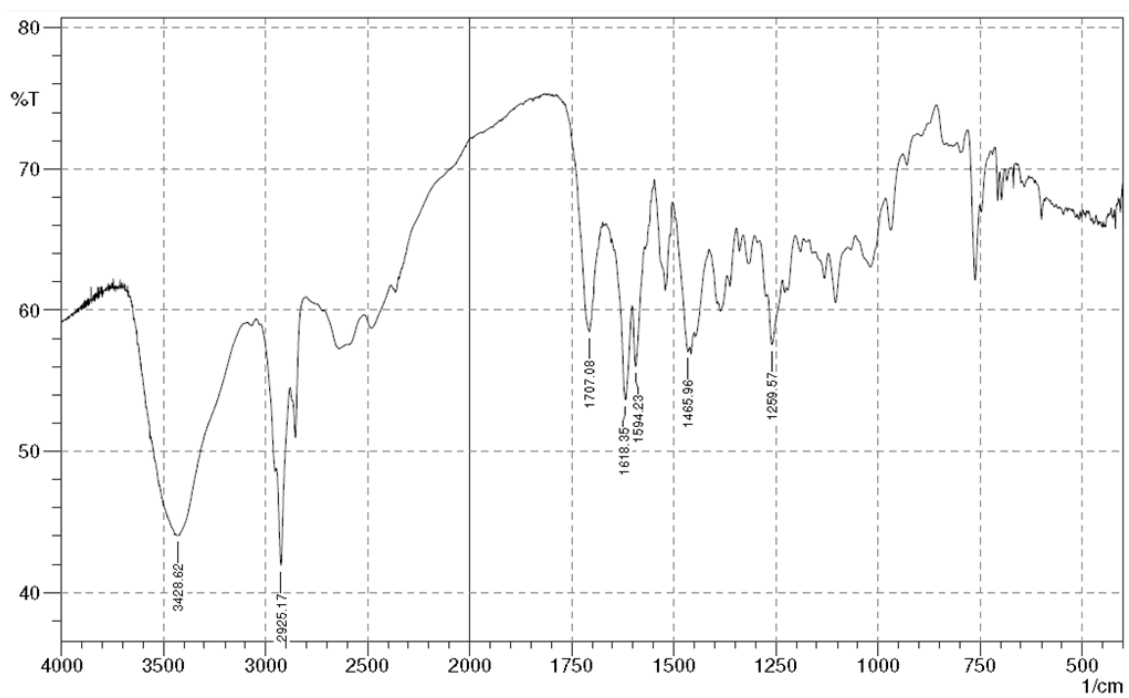


Figura 46: Espectro de IV do composto **1**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO VI: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC, HMBC) E IV DO COMPOSTO **2**

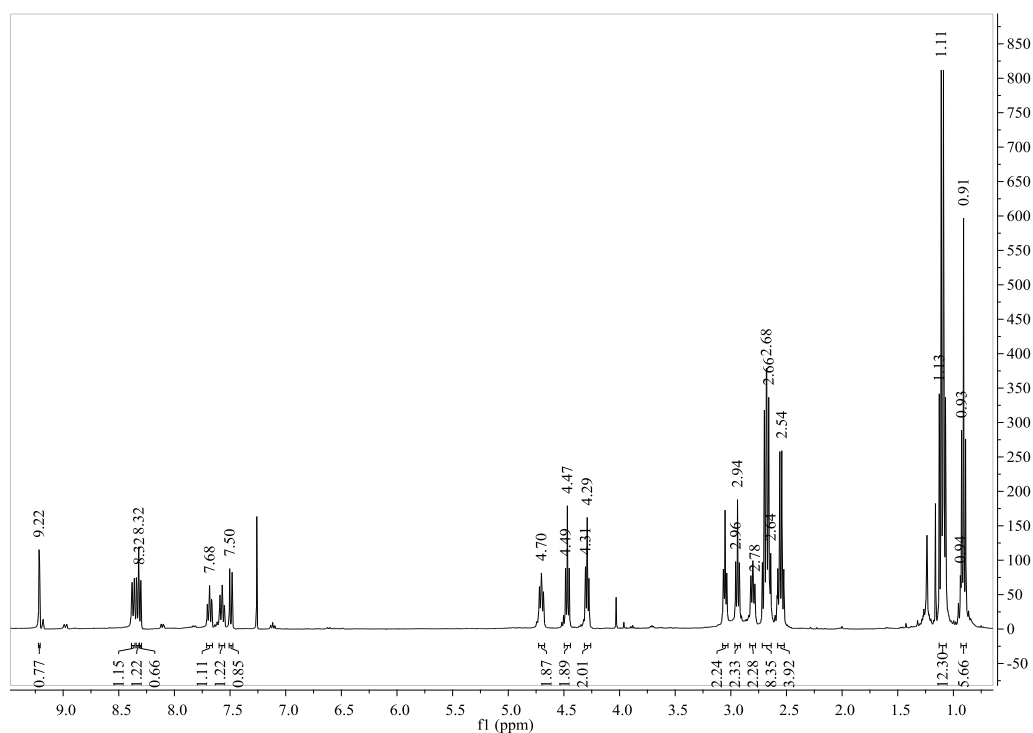


Figura 47: Espectro de ^1H RMN do composto **2**, traçado em CDCl_3 .

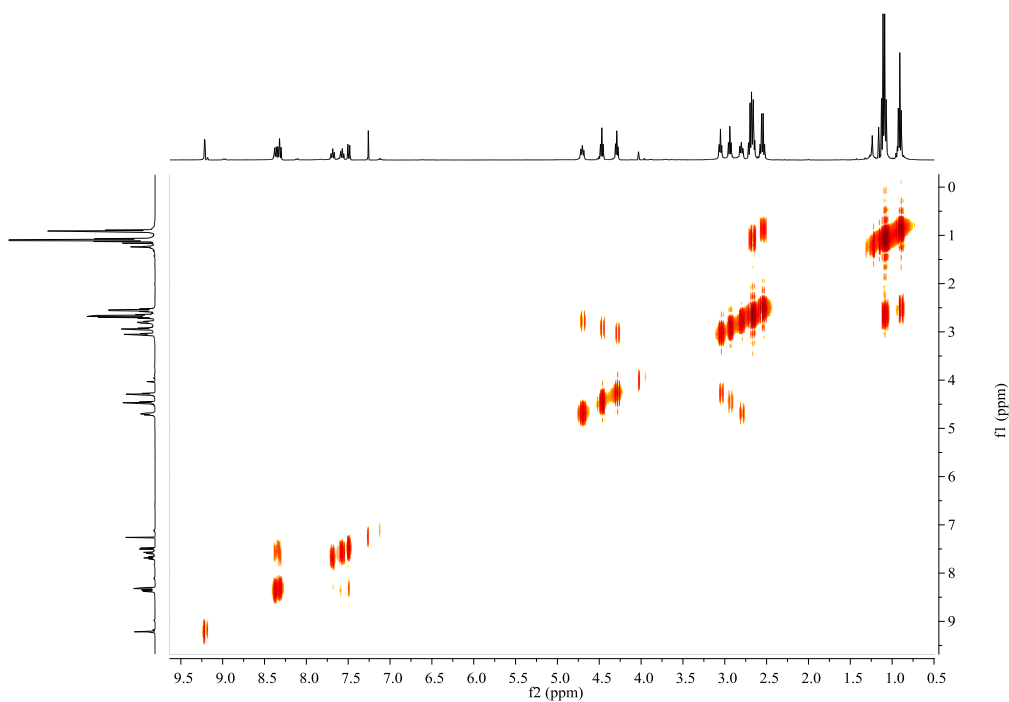


Figura 48: Espectro de COSY do composto **2**, traçado em CDCl_3 .

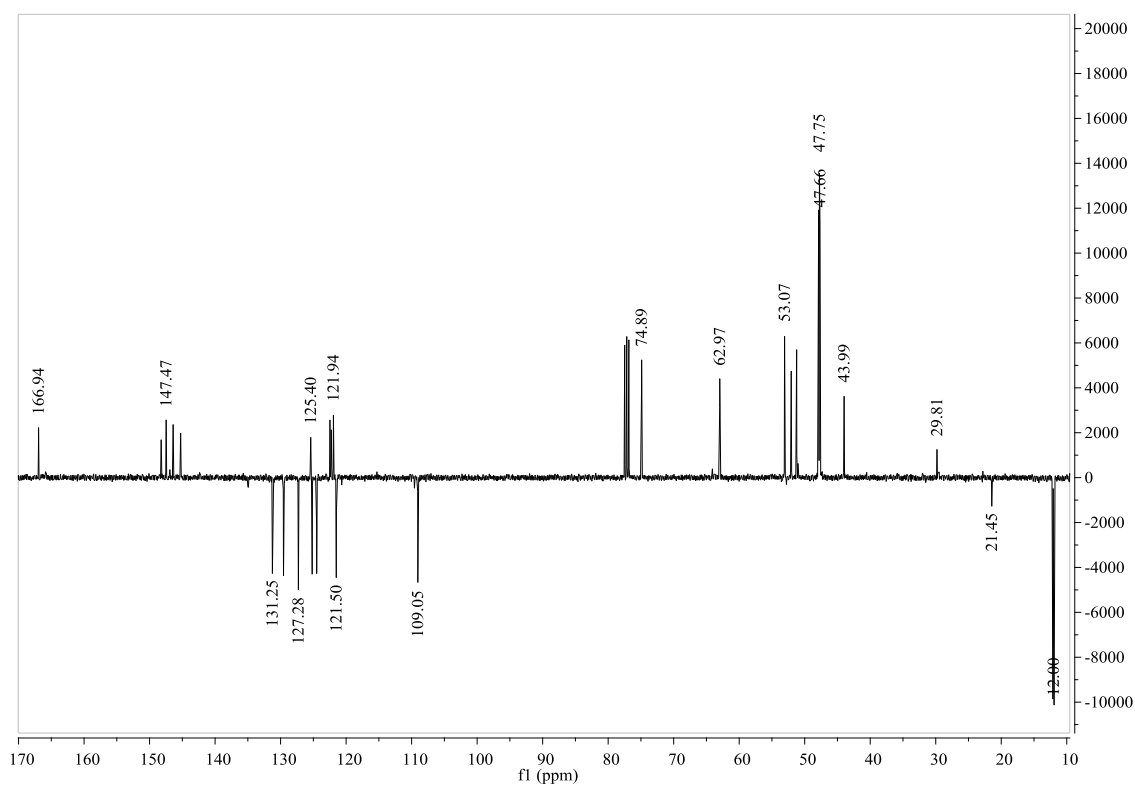


Figura 49: Espectro de ^{13}C RMN do composto **2**, traçado em CDCl_3 .

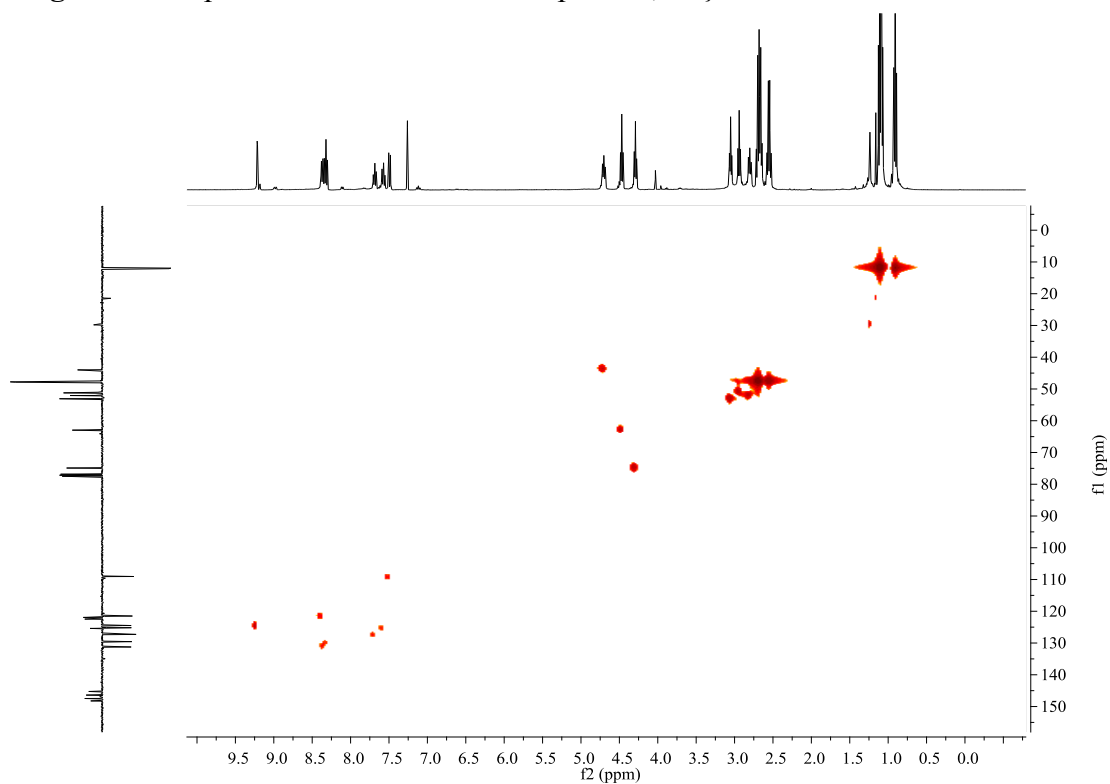


Figura 50: Espectro de HMQC do composto **2**, traçado em CDCl_3 .

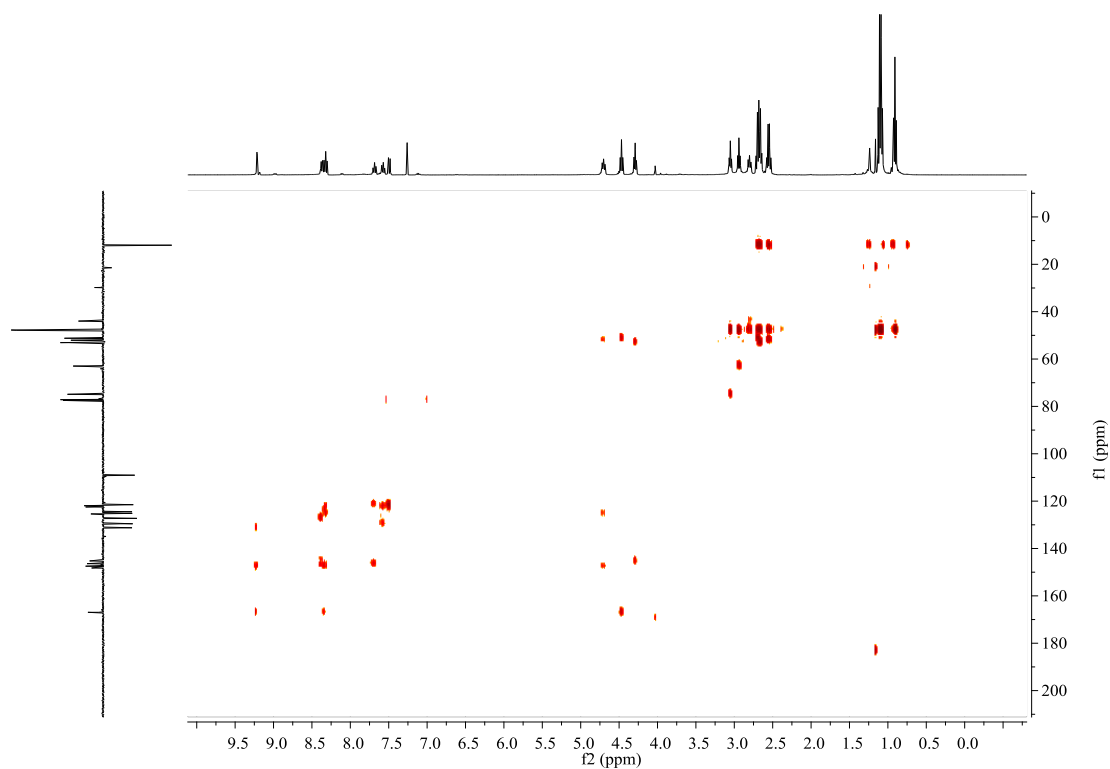


Figura 51: Espectro de HMBC do composto **2**, traçado em CDCl_3 .

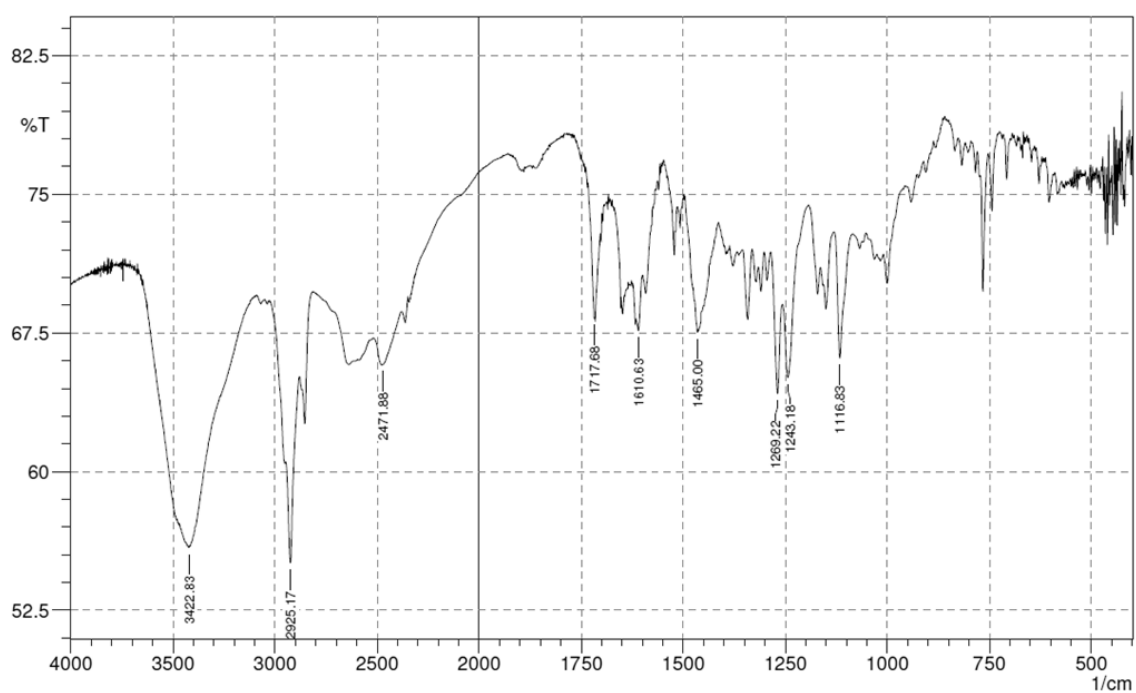


Figura 52: Espectro de IV do composto **2**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO VII: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC) E IV DO COMPOSTO **3**

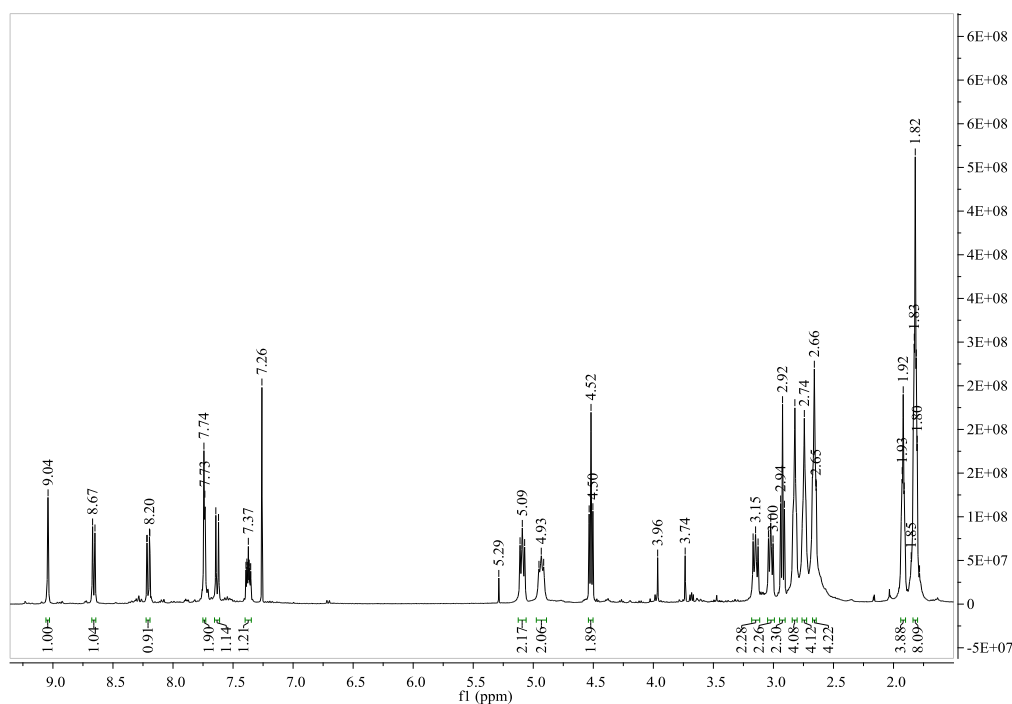


Figura 53: Espectro de ^1H RMN do composto **3**, traçado em CDCl_3 .

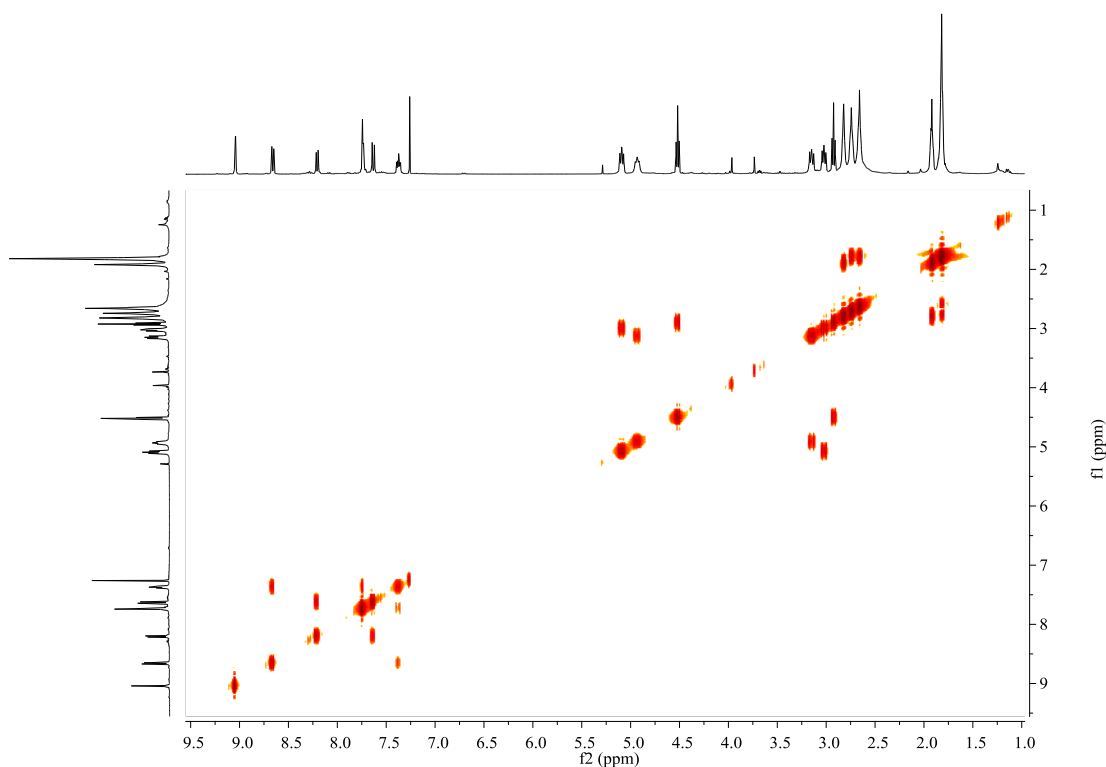


Figura 54: Espectro de ^1H RMN do composto **3**, traçado em CDCl_3 .

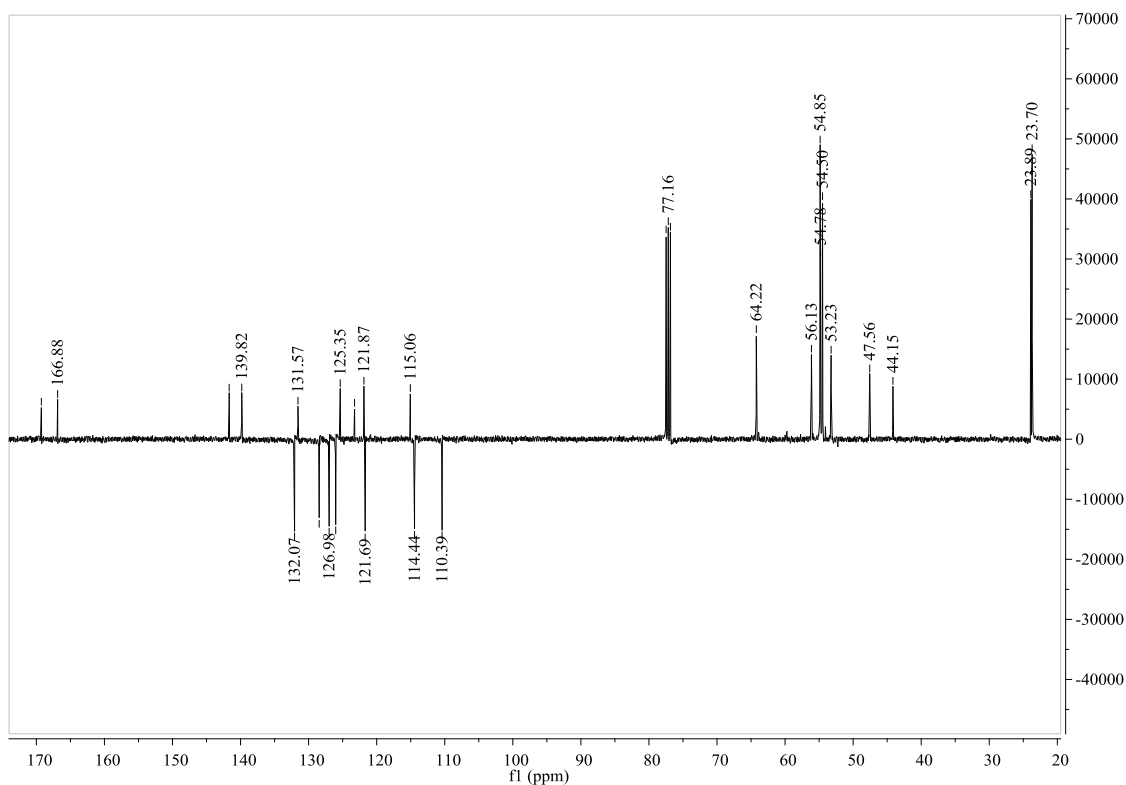


Figura 55: Espectro de ¹³C RMN do composto **3**, traçado em CDCl₃.

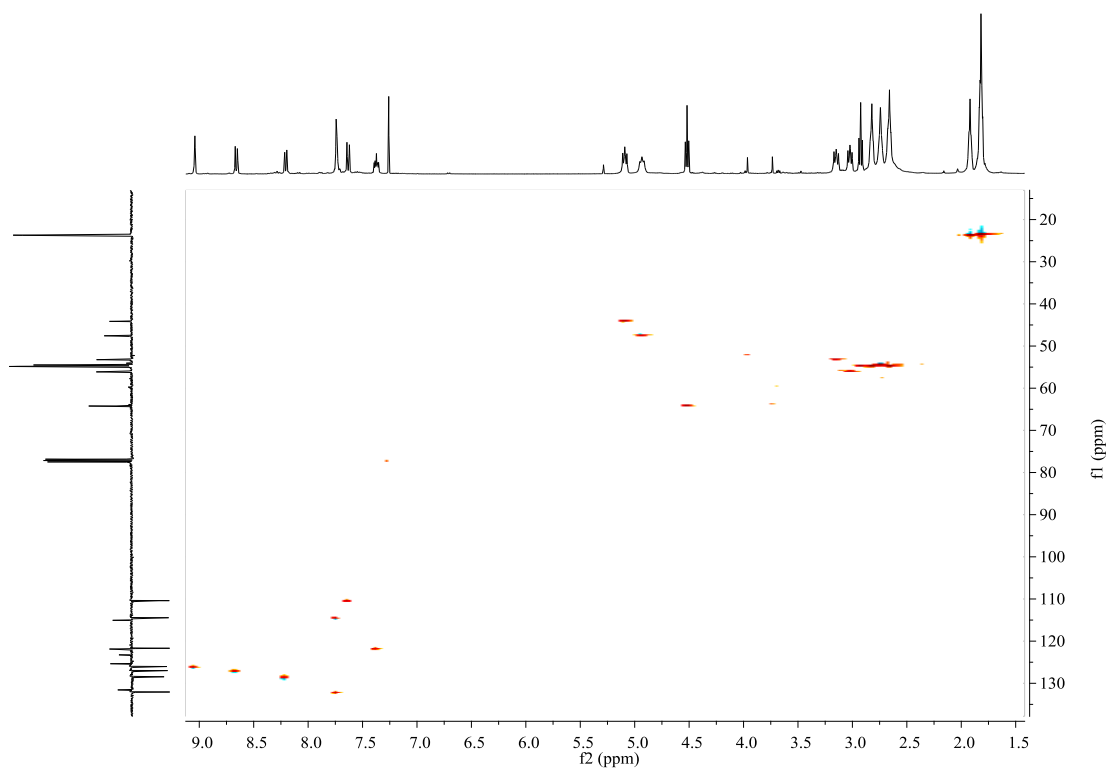


Figura 56: Espectro de HMQC do composto **3**, traçado em CDCl₃.

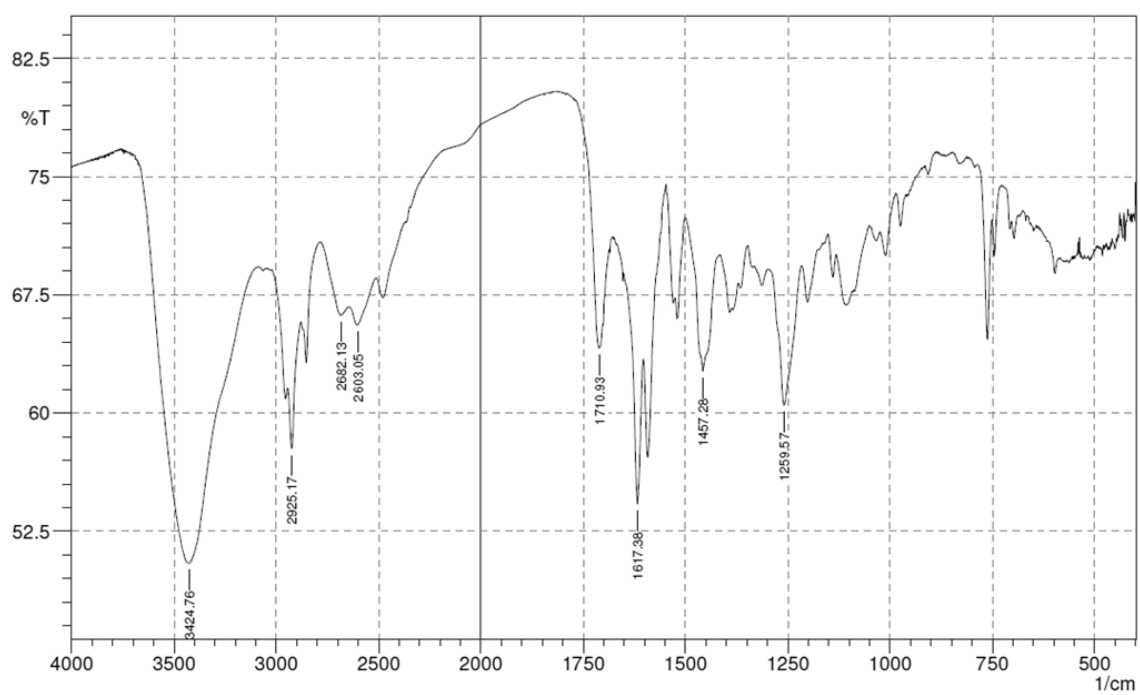


Figura 57: Espectro de IV do composto **3**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO VIII: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC) E IV DO COMPOSTO **4**

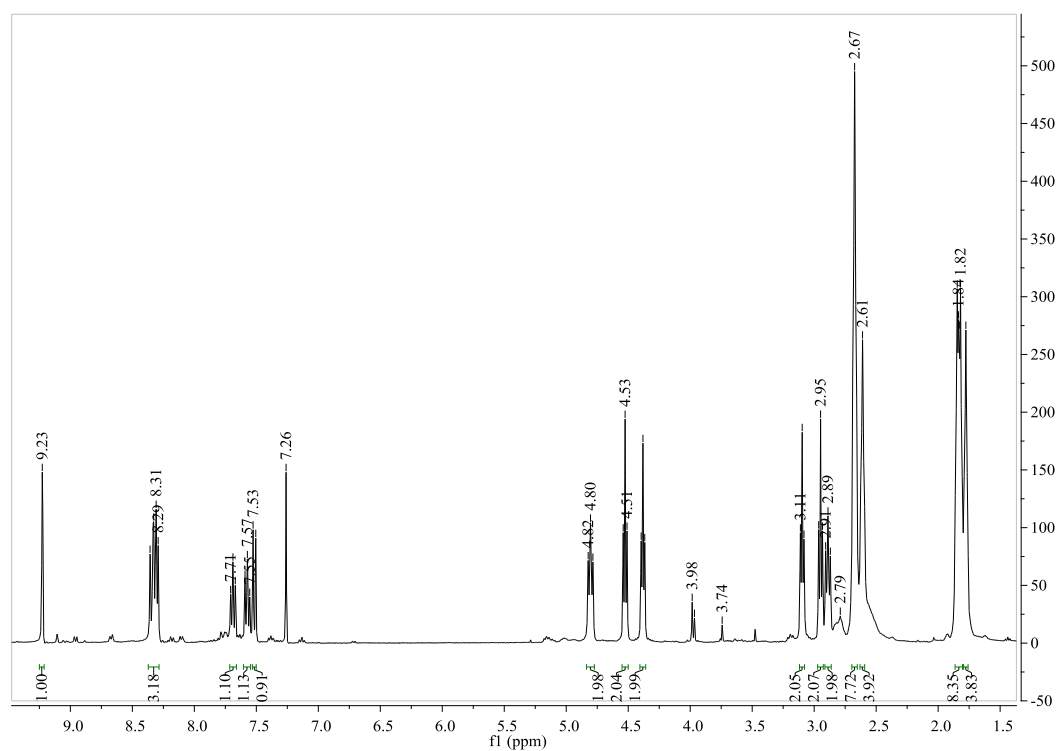


Figura 58: Espectro de ^1H RMN do composto **4**, traçado em CDCl_3 .

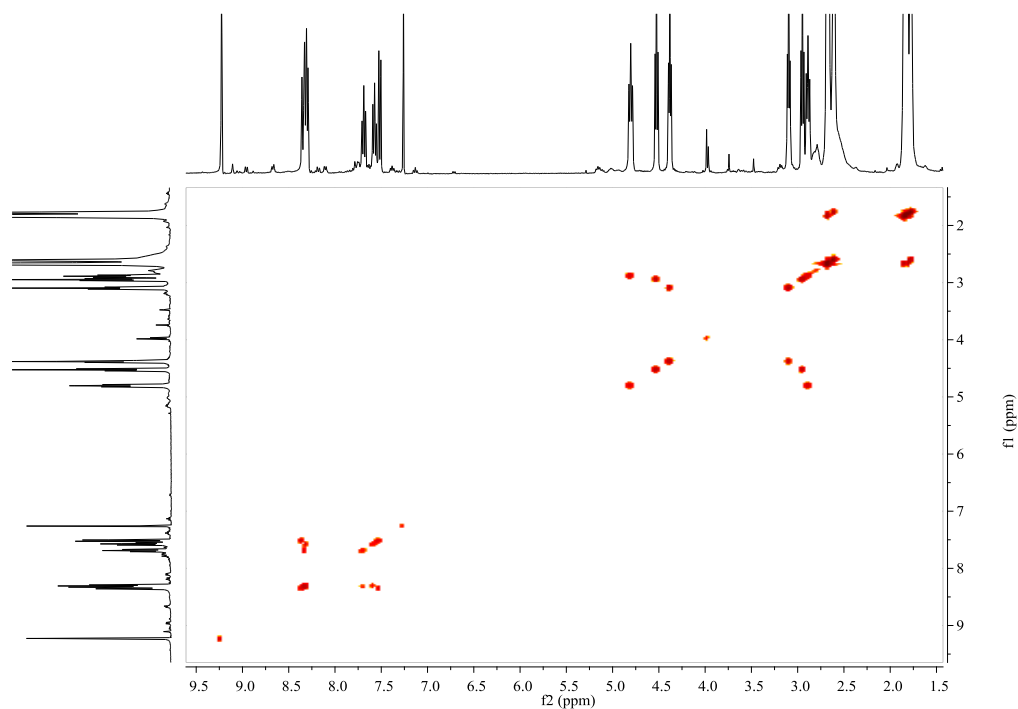


Figura 59: Espectro de COSY do composto **4**, traçado em CDCl_3 .

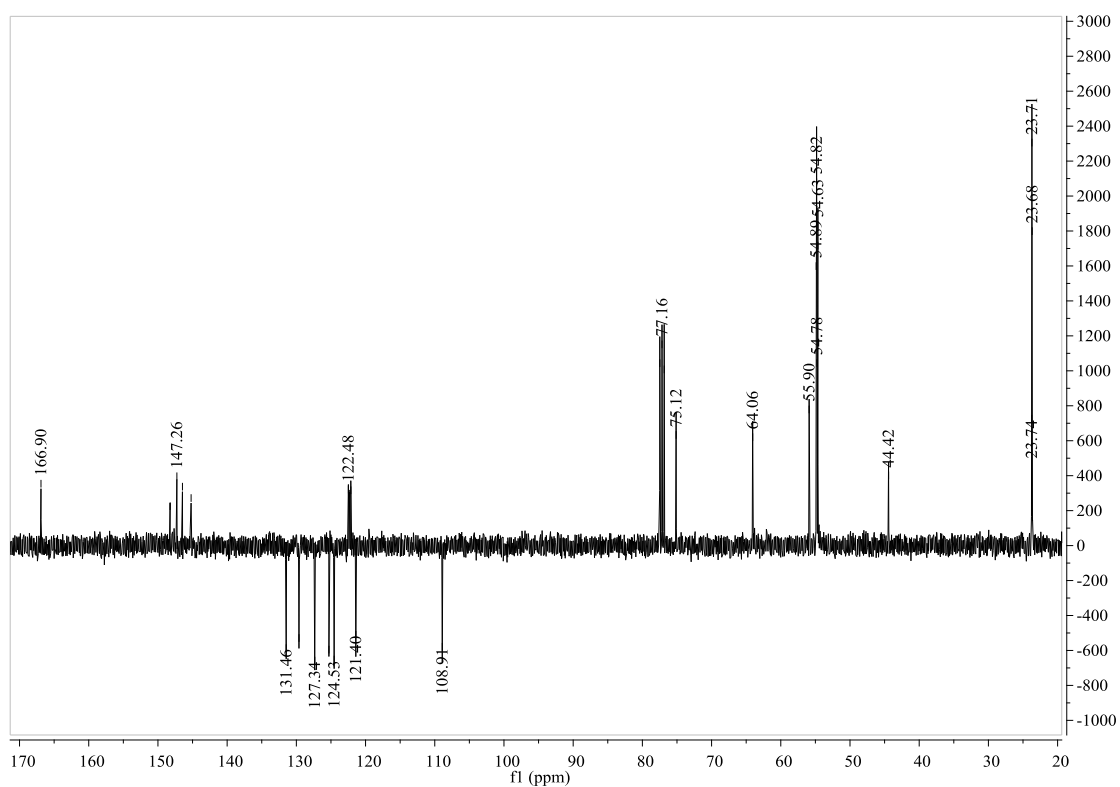


Figura 60: Espectro de ¹³C RMN do composto **4**, traçado em CDCl₃.

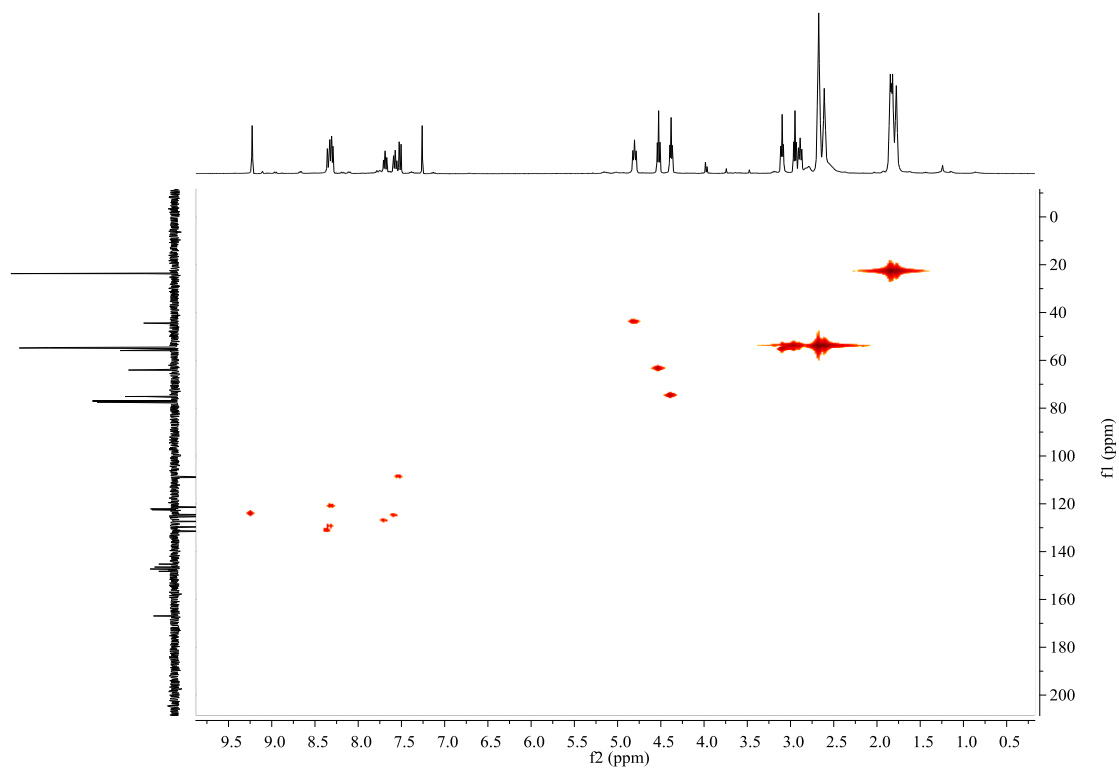


Figura 61: Espectro de HMQC do composto **4**, traçado em CDCl₃.

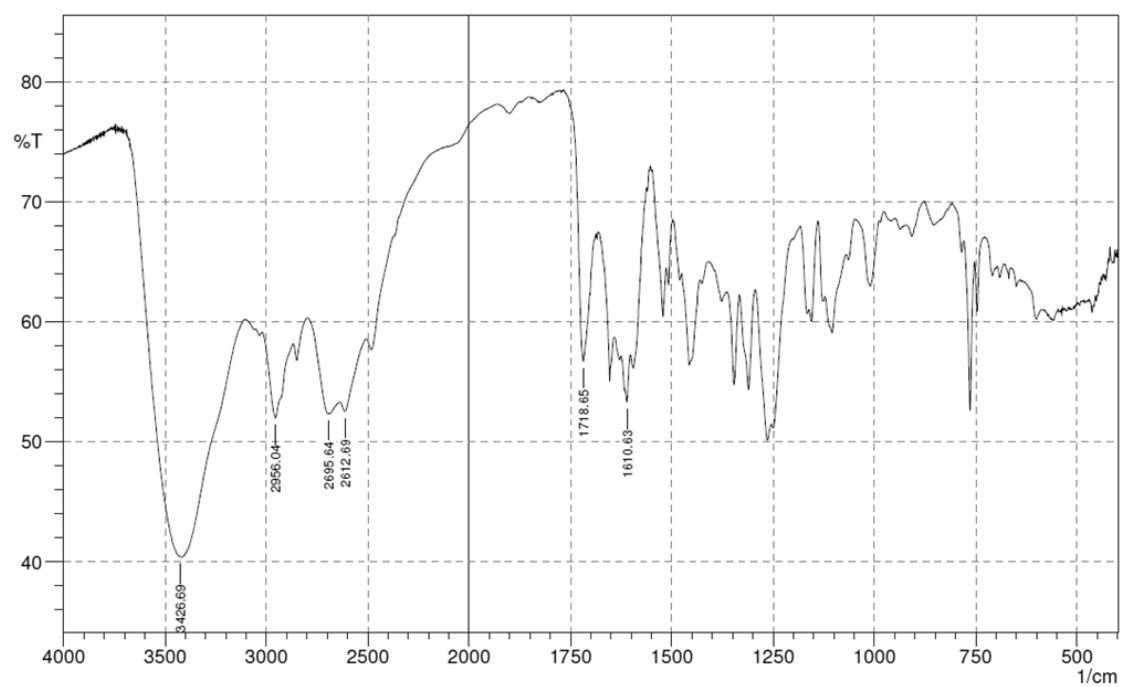


Figura 62: Espectro de IV do composto **4**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO IX: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC) DO COMPOSTO **5**

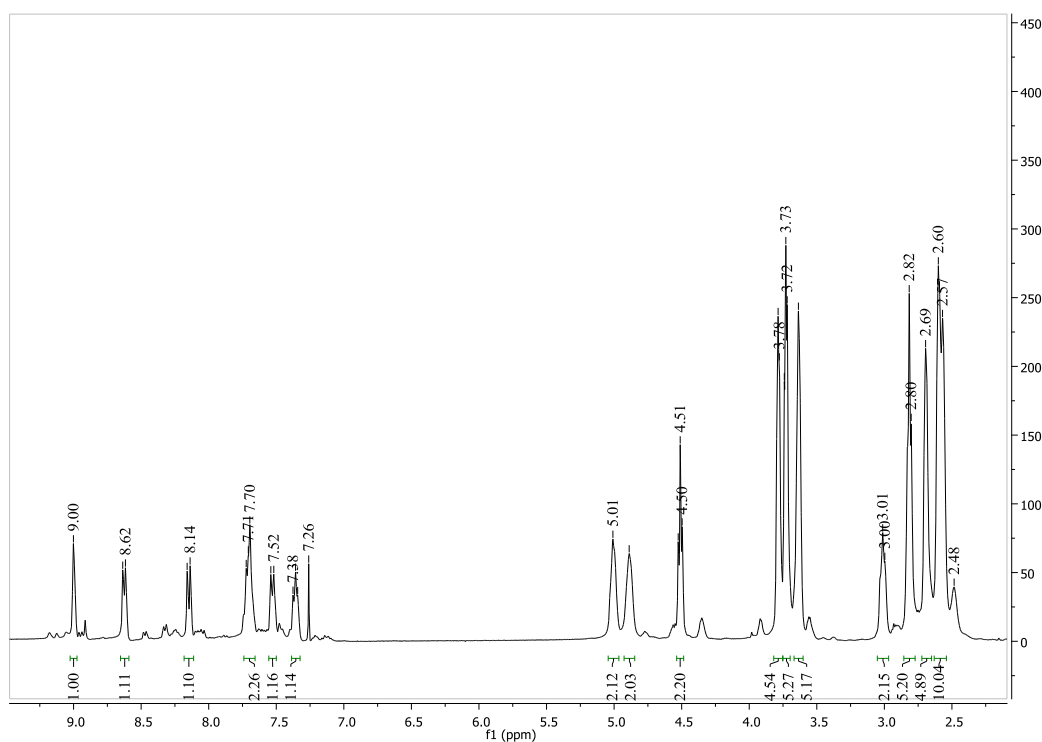


Figura 63: Espectro de ^1H RMN do composto **5**, traçado em CDCl_3 .

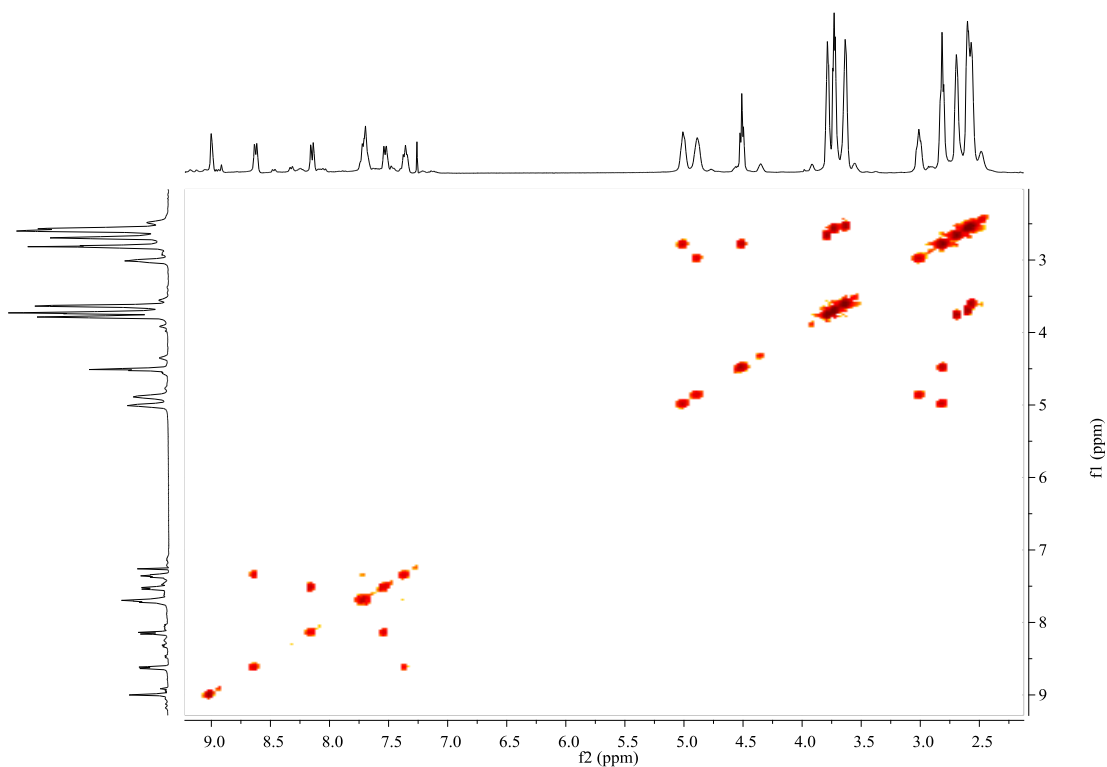


Figura 64: Espectro de COSY do composto **5**, traçado em CDCl_3 .

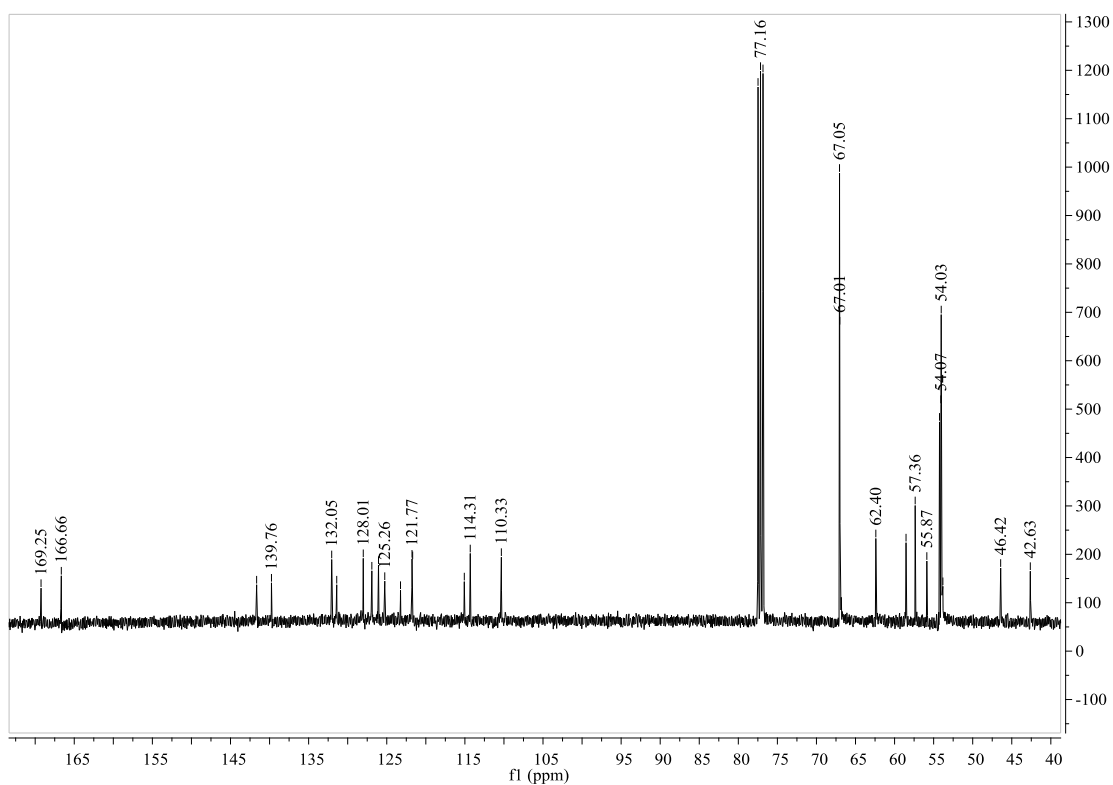


Figura 65: Espectro de ^{13}C RMN do composto **5**, traçado em CDCl_3 .

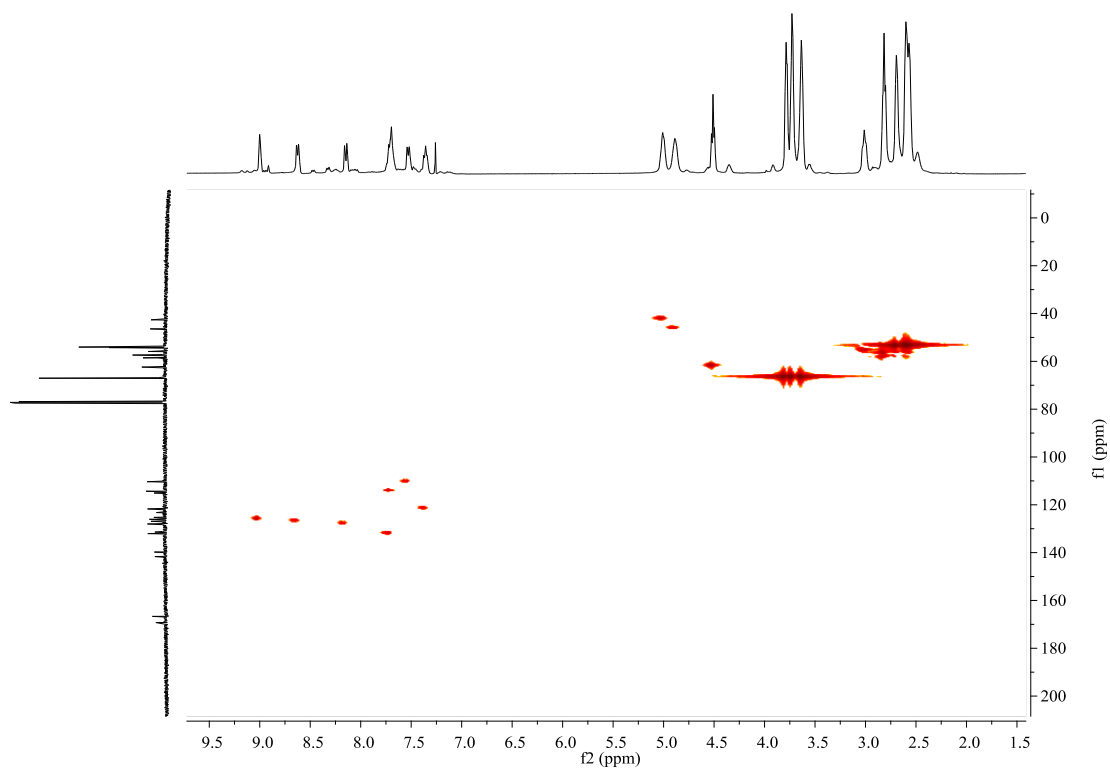


Figura 66: Espectro de HMQC do composto **5**, traçado em CDCl_3 .

ANEXO X: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC) E IV DO COMPOSTO 6

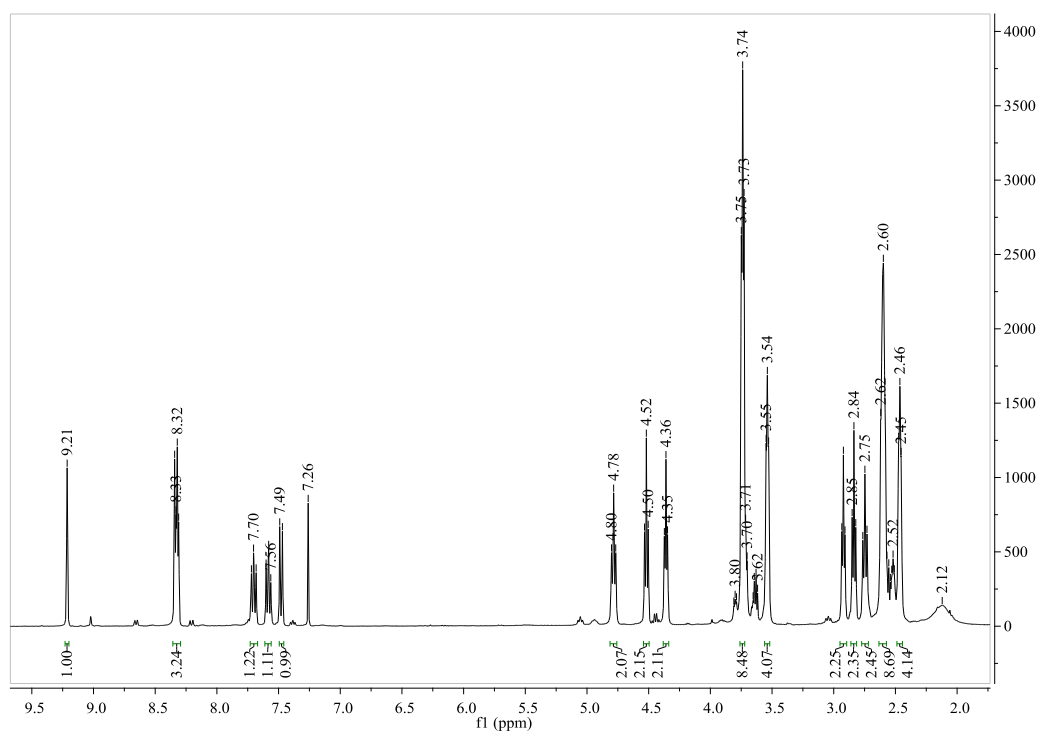


Figura 67: Espectro de ^1H RMN do composto 6, traçado em CDCl_3 .

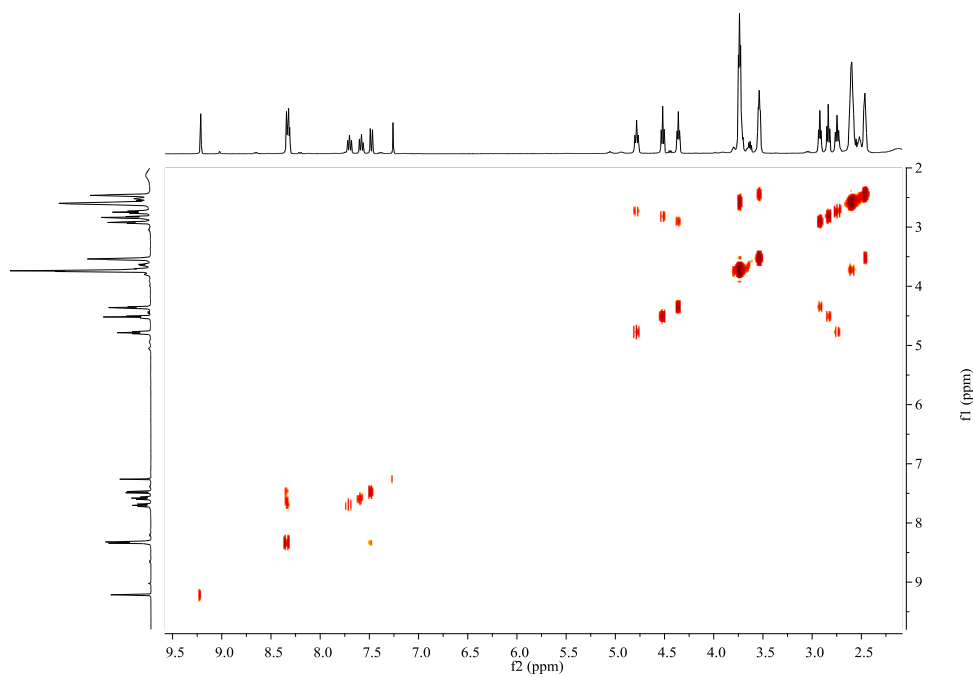


Figura 68: Espectro de COSY do composto 6, traçado em CDCl_3 .

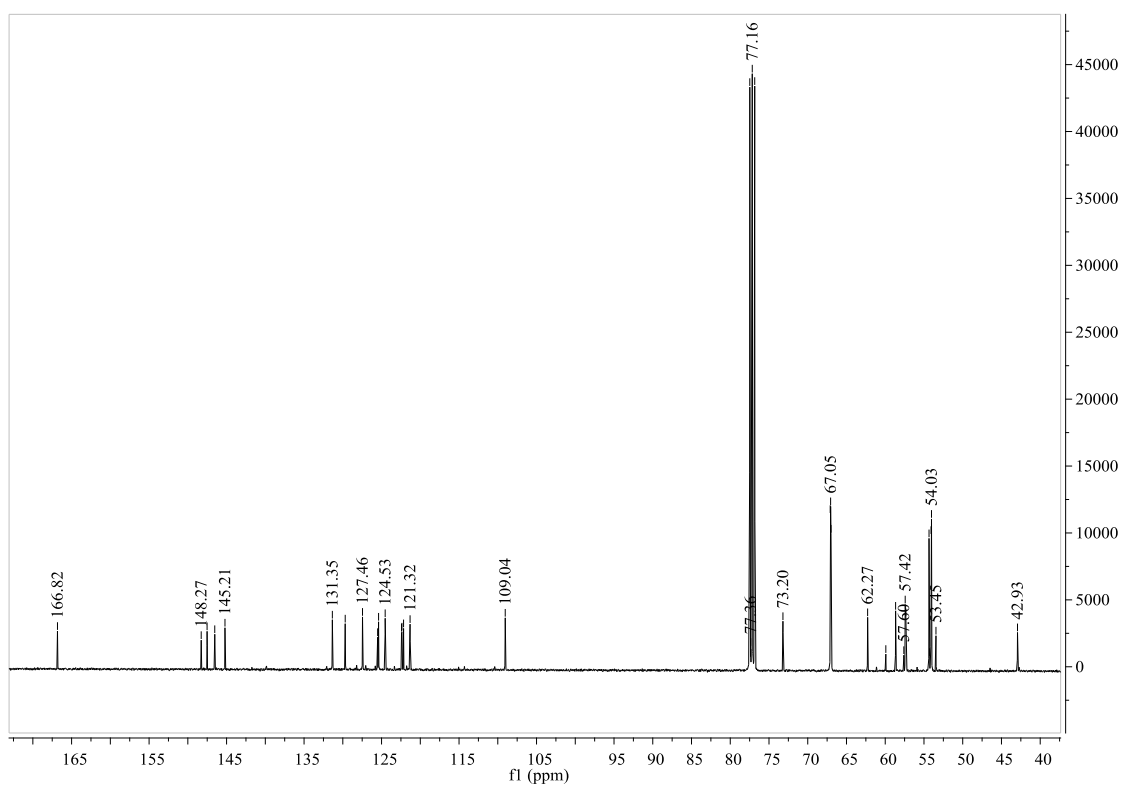


Figura 69: Espectro de ¹³C RMN do composto **6**, traçado em CDCl₃.

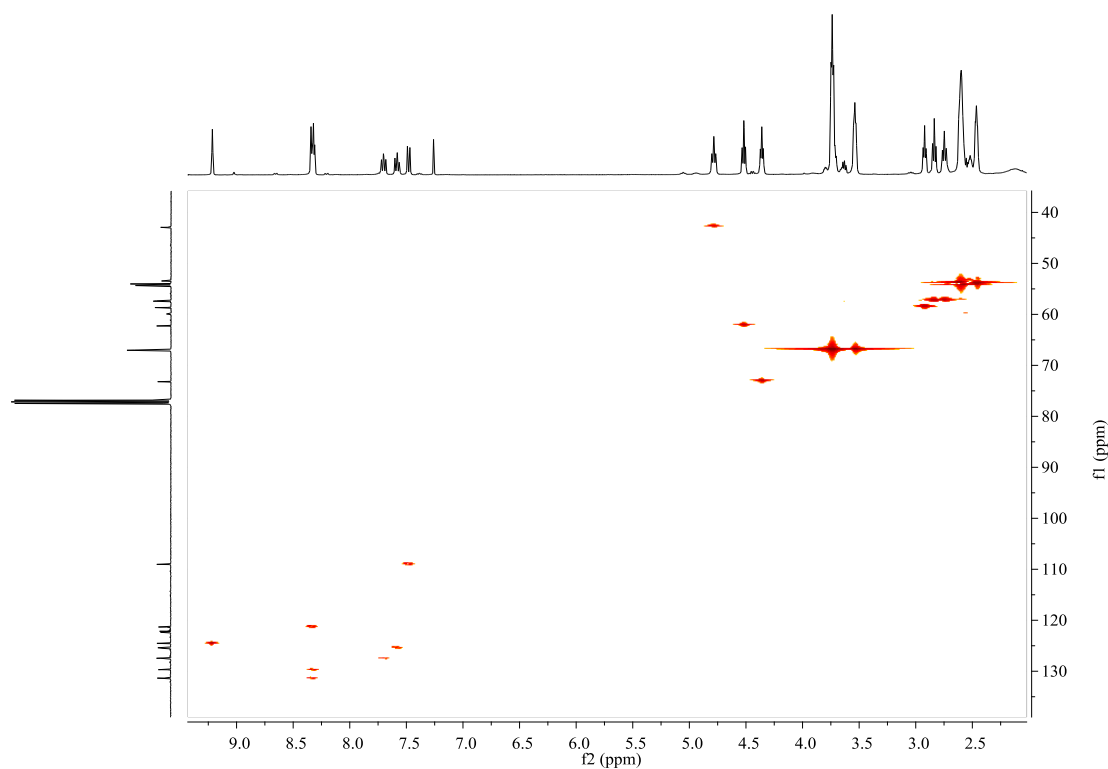


Figura 70: Representação parcial do espectro de HMQC do composto **6**, traçado em CDCl₃.

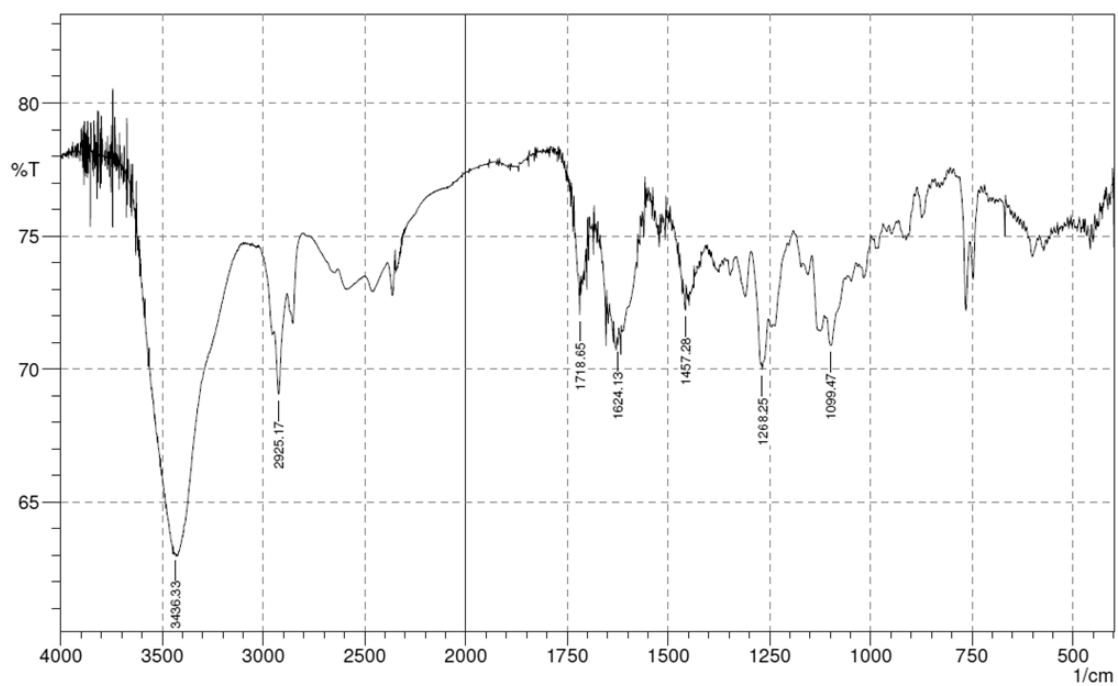


Figura 71: Espectro de IV do composto **6**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO XI: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC) E IV DO COMPOSTO 7

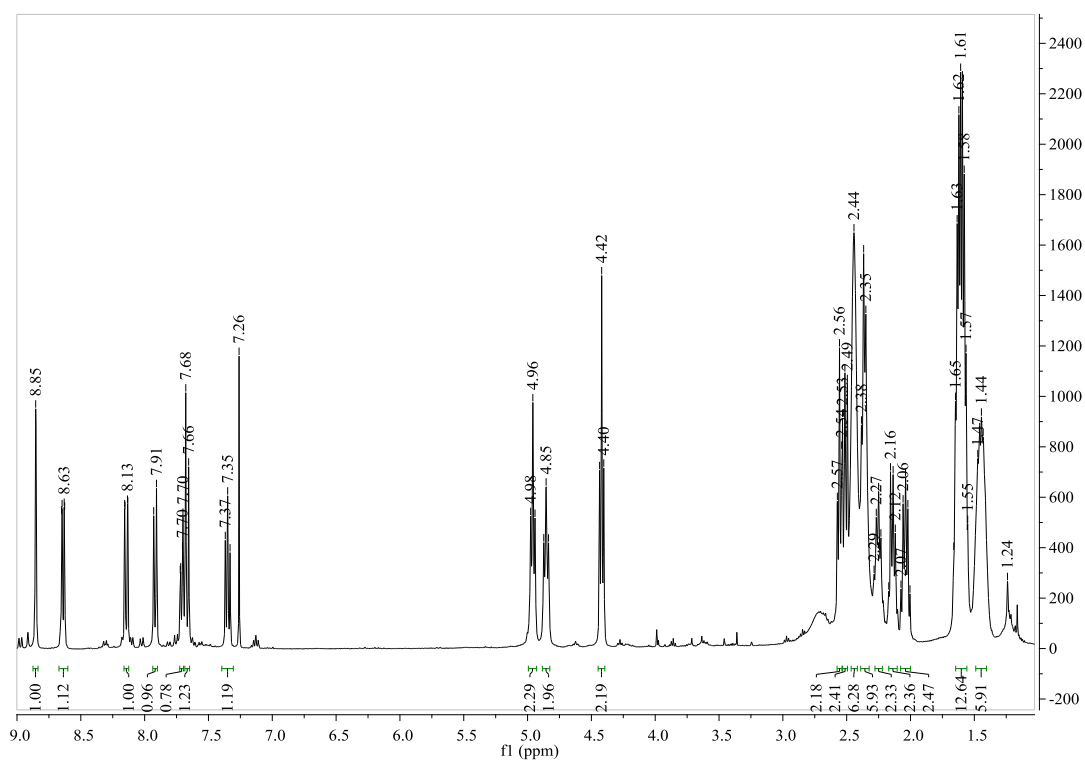


Figura 72: Espectro de ^1H RMN do composto 7, traçado em CDCl_3 .

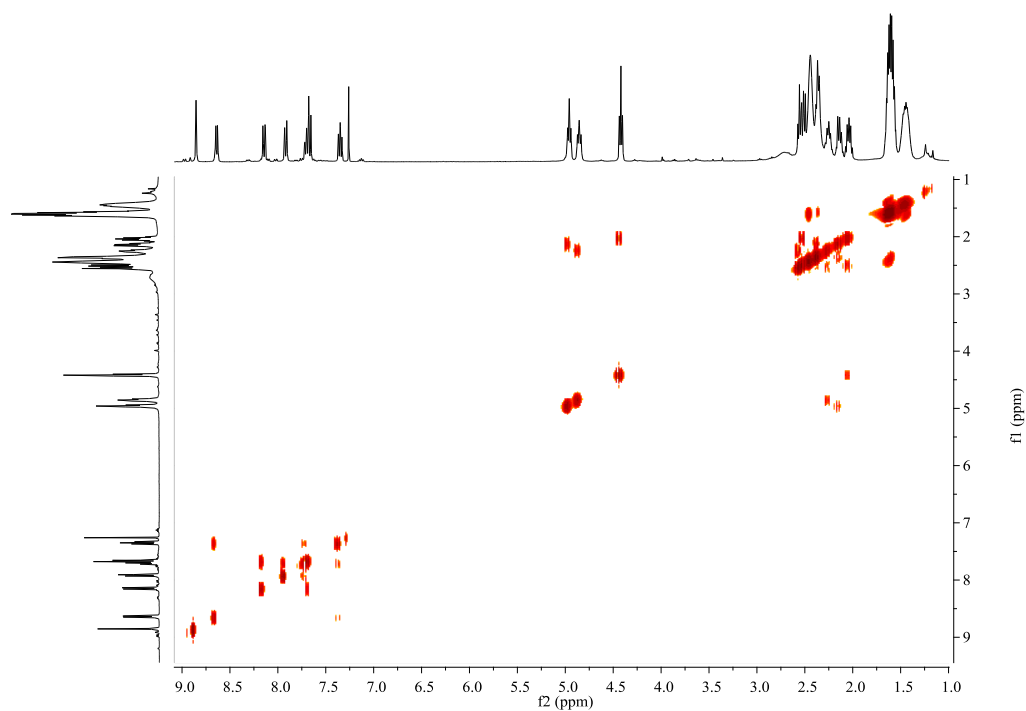


Figura 73: Espectro de COSY do composto 7, traçado em CDCl_3 .

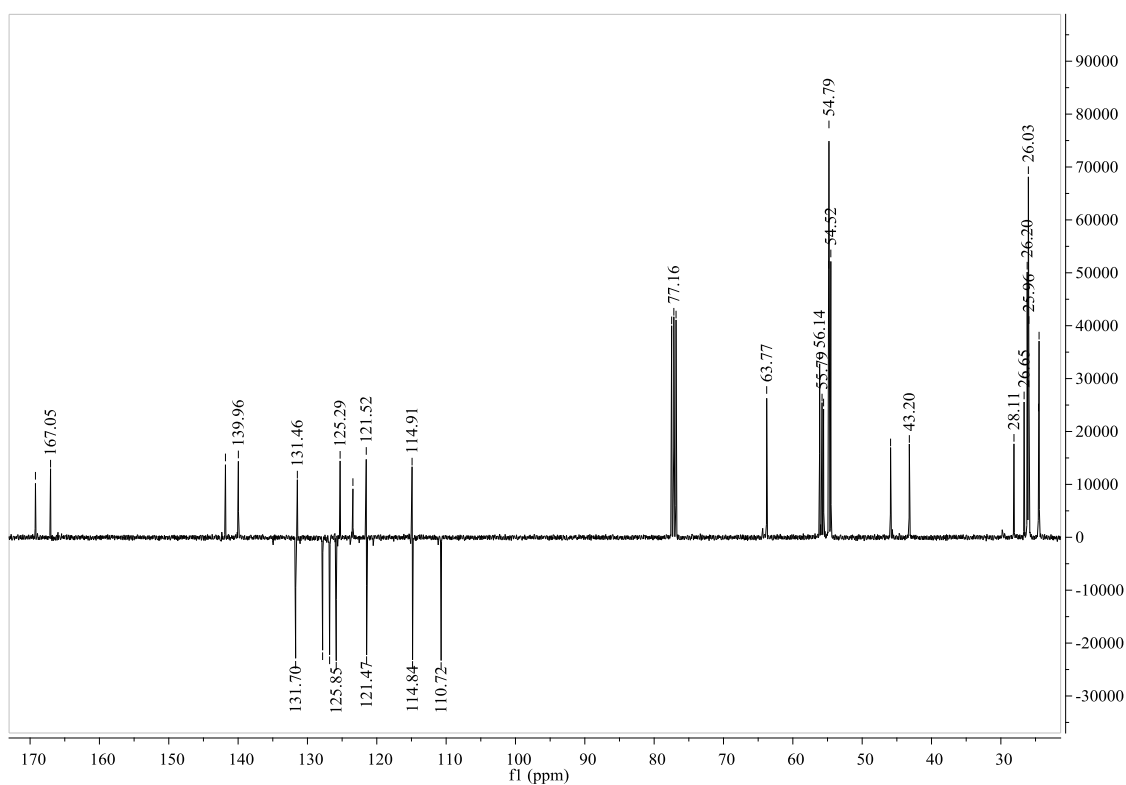


Figura 74: Espectro de ¹³C RMN do composto **7**, traçado em CDCl₃.

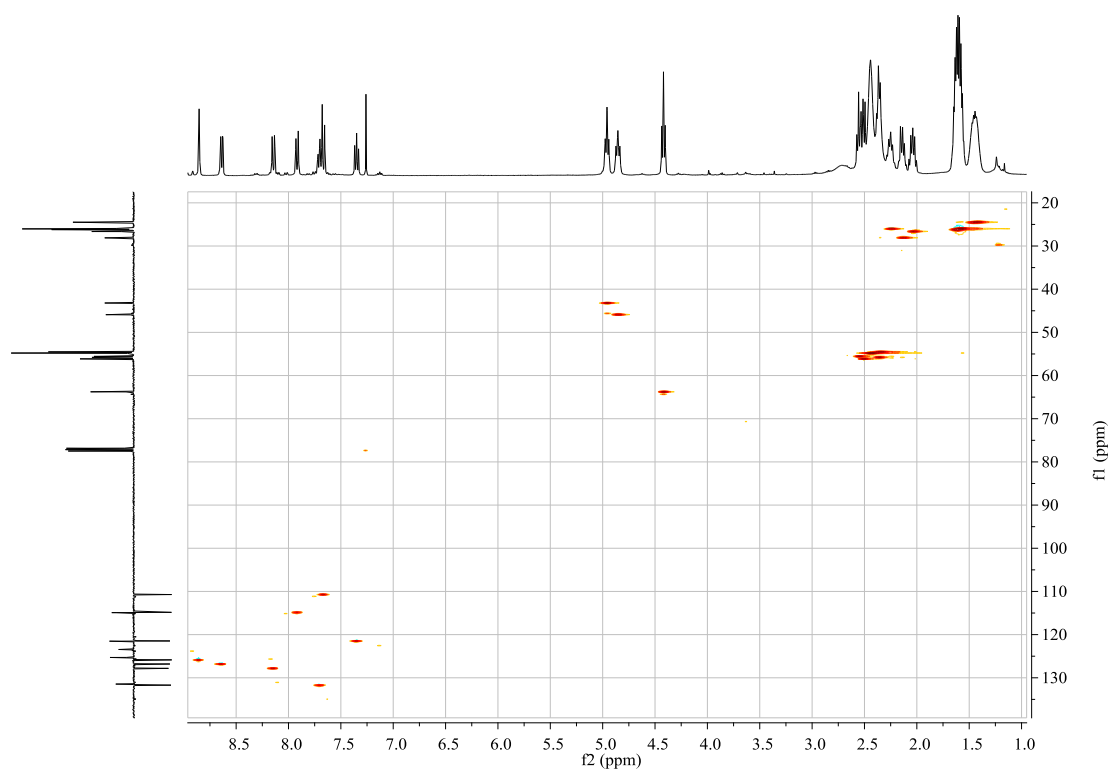


Figura 75: Espectro de HMQC do composto **7**, traçado em CDCl₃.

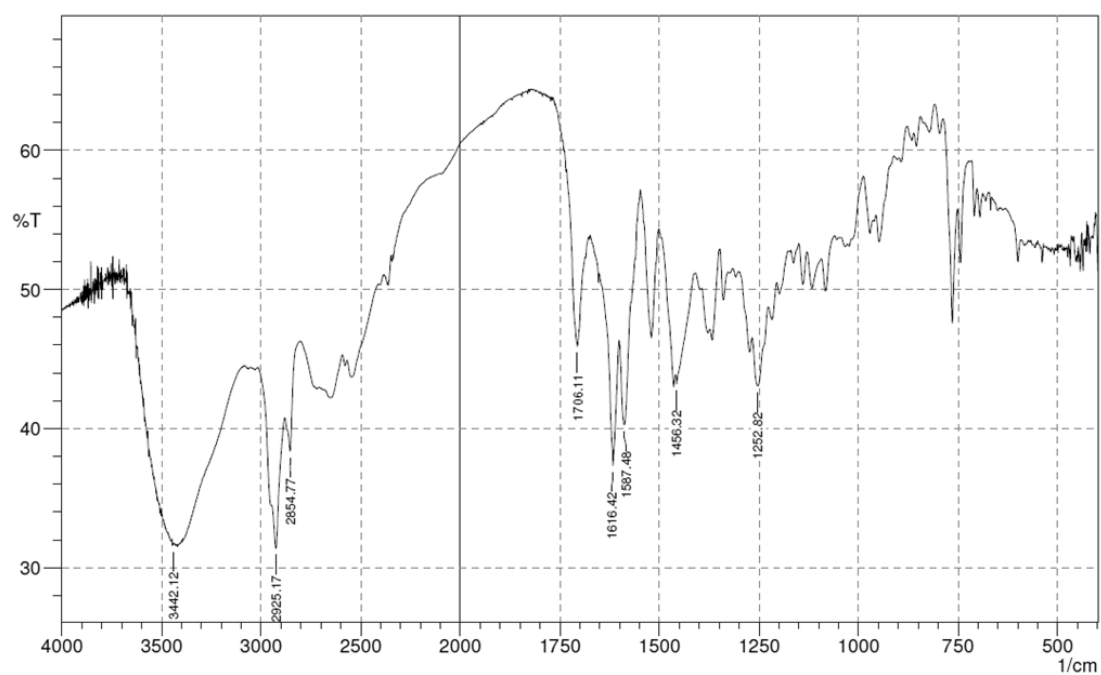


Figura 76: Espectro de IV do composto **7**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO XII: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY, ^{13}C , HMQC) E IV DO COMPOSTO **8**

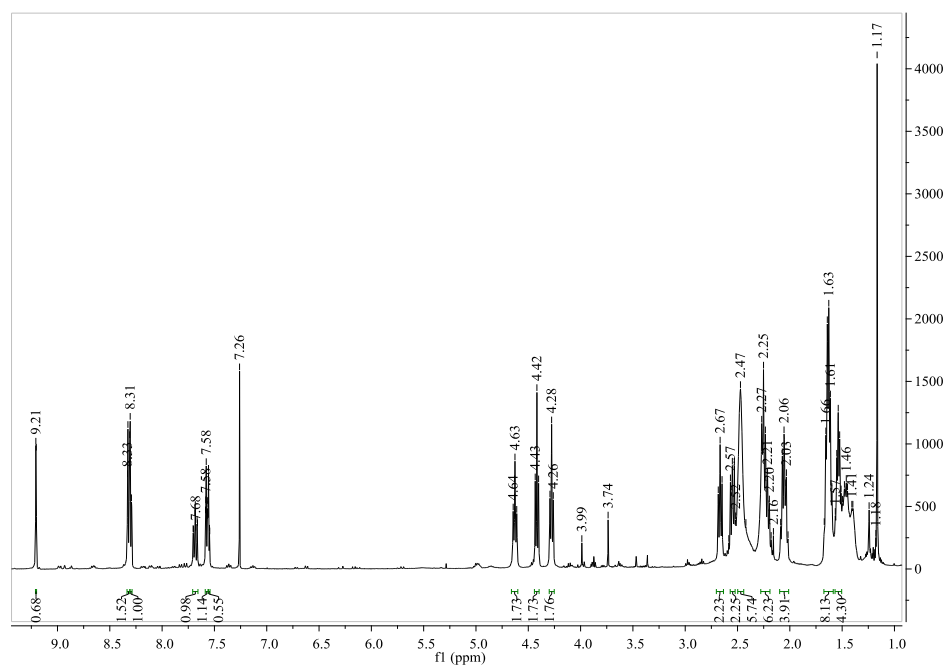


Figura 77: Espectro de ^1H RMN do composto **8**, traçado em CDCl_3 .

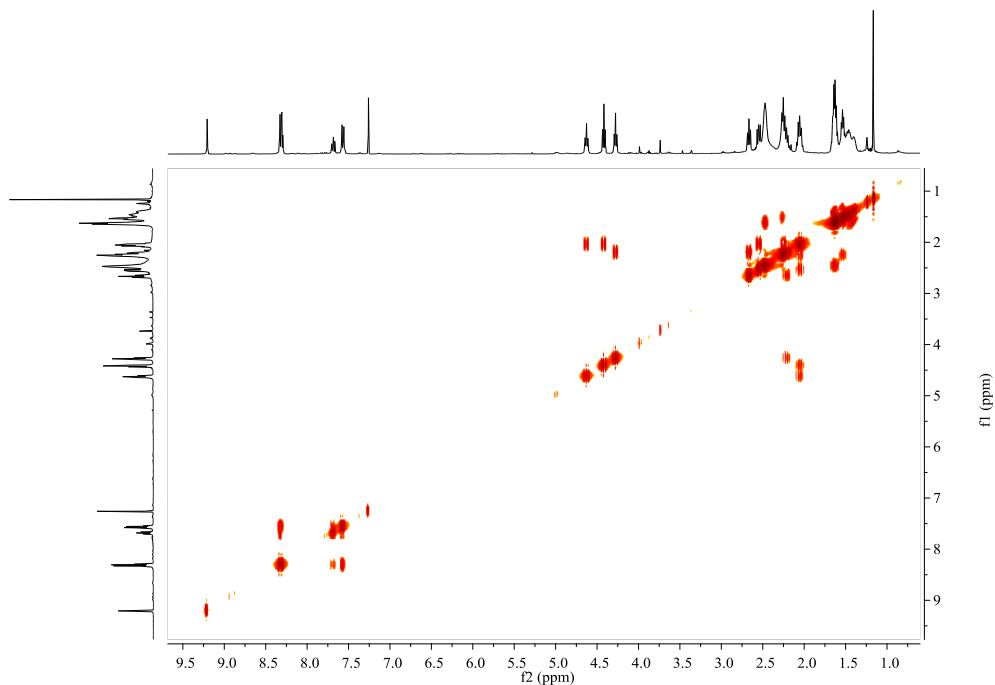


Figura 78: Espectro de COSY do composto **8**, traçado em CDCl_3 .

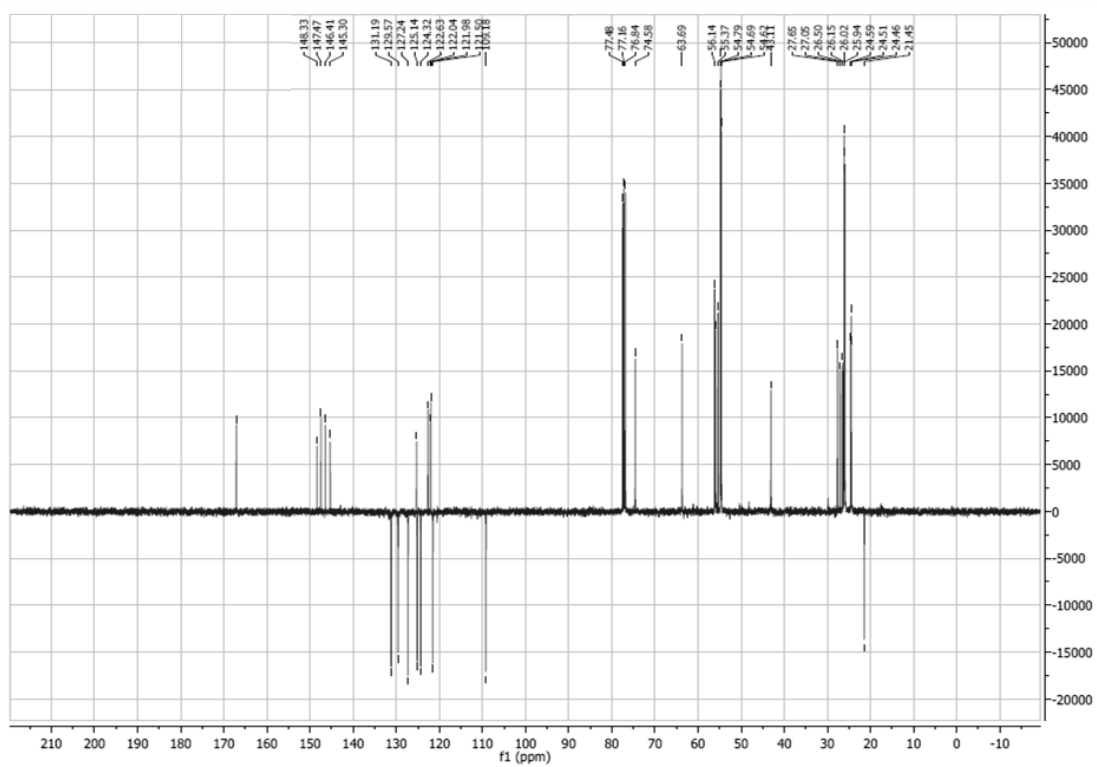


Figura 79: Espectro de ^{13}C RMN do composto **8**, traçado em CDCl_3 .

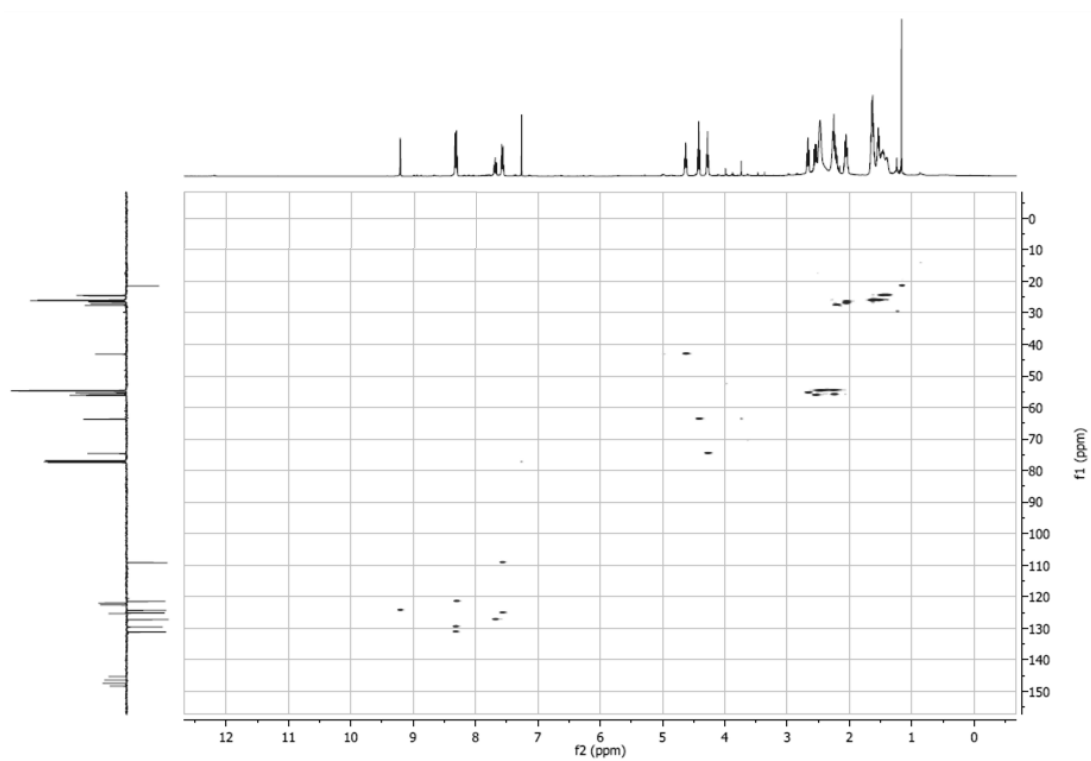


Figura 80: Espectro de HMQC do composto **8**, traçado em CDCl_3 .

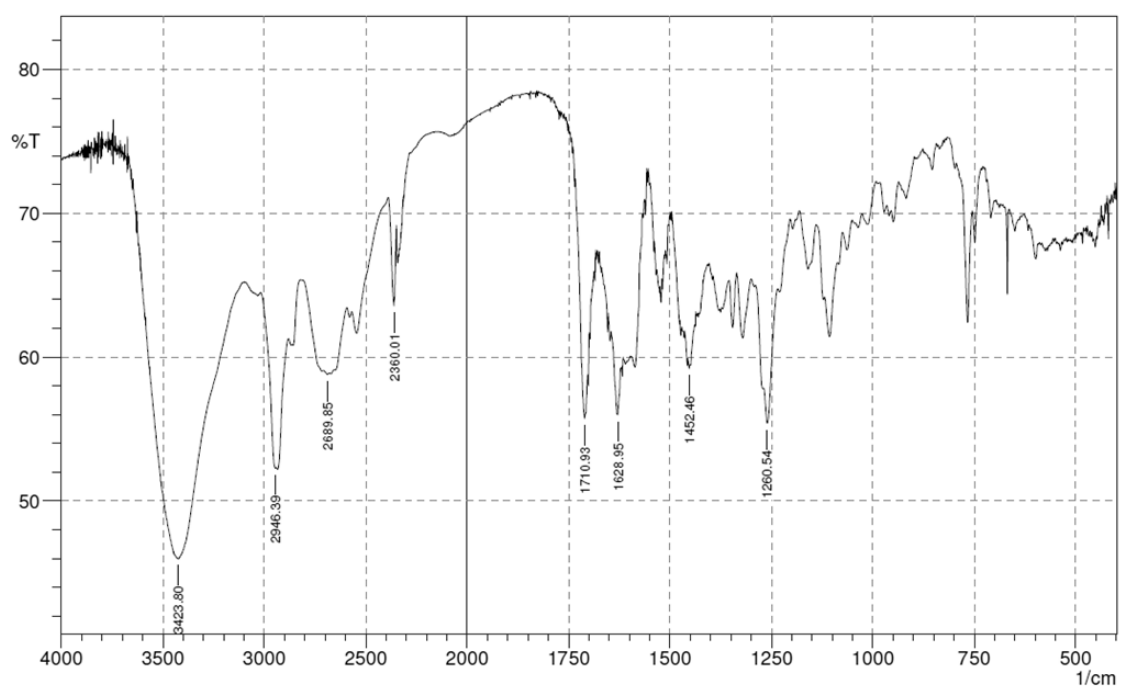


Figura 81: Espectro de IV do composto **8**, traçado em pastilhas de brometo de potássio.

ANEXO XIII: ESPECTROS DE RMN (^1H , COSY) DO COMPOSTO **9**

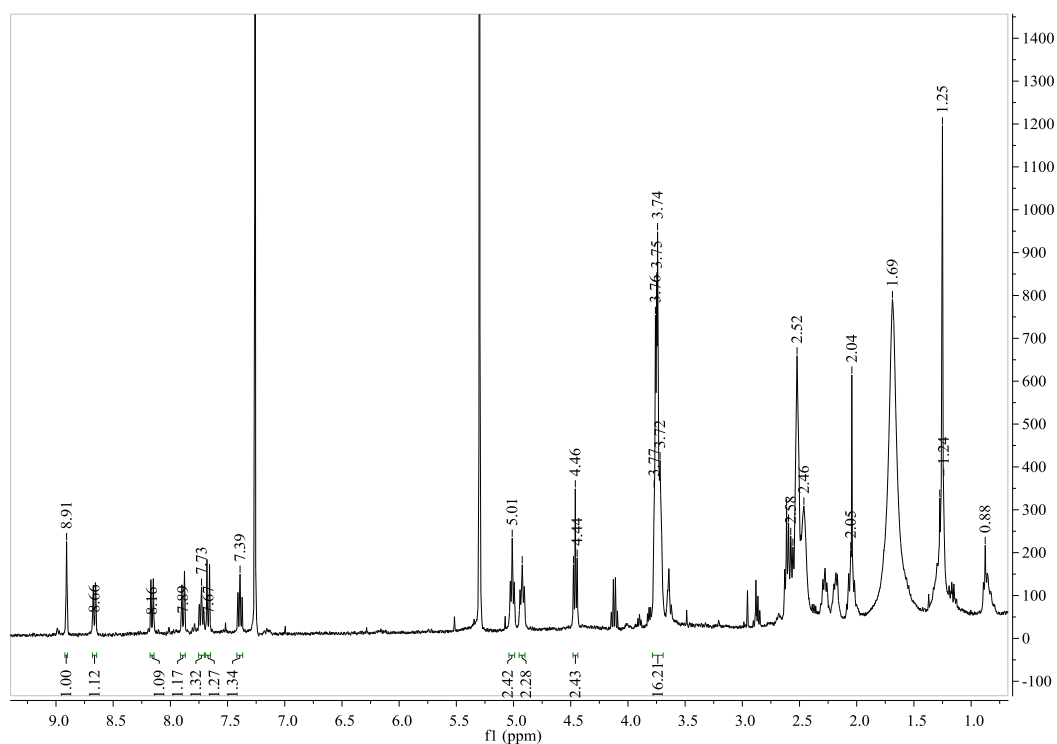


Figura 82: Espectro de ^1H RMN do composto **9**, traçado em CDCl_3 .

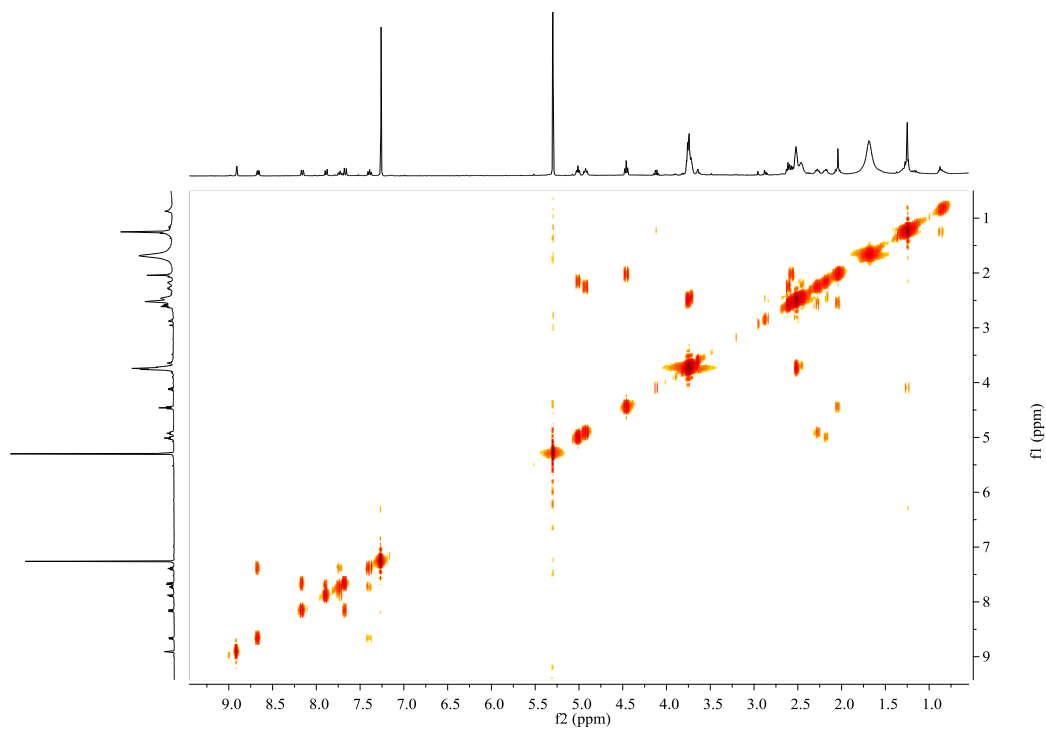


Figura 83: Espectro de COSY do composto **9**, traçado em CDCl_3 .

ANEXO XIV: RESULTADOS DE ΔT_M OBTIDOS À CONCENTRAÇÃO DE 1 μM PARA OS COMPOSTOS 1-4 E 6-8

Tabela 29: Diferencial nas temperaturas de fusão dos diferentes G-quadruplexos e da cadeia de ADN duplex para os compostos **1-4** e **6-8** à concentração de 1 μM .

			ΔT_m (°C)				
Composto	Tipo	R	F21T	HSP90A	KRas21	T-loop	Selectividade
1	N,N,COOR		7,6	11,0	3,6	1,0	7,6 : 3,6 : 11,0 : 1,0
2	N,O,COOR		9,7	14,2	8,0	1,3	7,5 : 6,2 : 10,9 : 1,0
3	N,N,COOR		12,6	14,3	10,2	3,0	4,2 : 3,4 : 4,8 : 1,0
4	N,O,COOR		7,3	11.8	5,1	1,9	3,8 : 2,7 : 6,2 : 1,0
6	N,O,COOR		1,0	4,3	0,2	0,0	---
7	N,N,COOR		15,2	18,6	12,8	3,6	4,2 : 3,6 : 5,2 : 1,0
8	N,O,COOR		10,0	15,3	9,4	2,3	4,3 : 4,1 : 6,7 : 1,0
			± 0,2	± 0,2	± 0,2	± 0,1	

ANEXO XV: GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO ENTRE OS pK_A DOS ÁTOMOS DE AZOTO DOS ANÉIS TERMINAIS E OS RESULTADOS DE ΔT_M PARA OS COMPOSTOS **1-4** E **6-8**

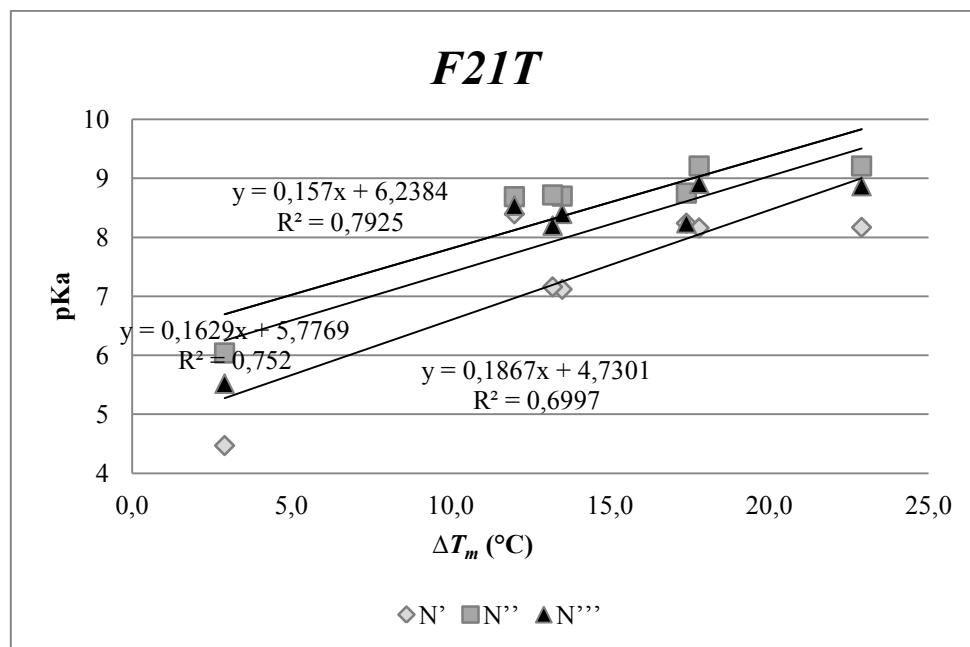


Gráfico 4: Relação entre o pK_a dos grupos azotados e ΔT_m (°C) do composto obtida para cada um dos tipos de cadeia lateral (*F21T*).

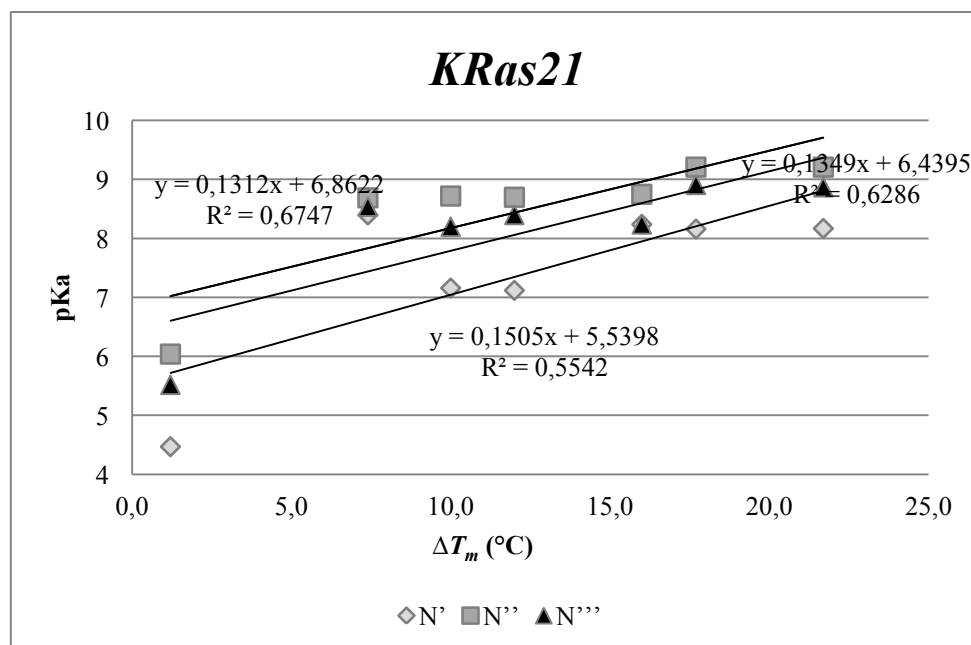


Gráfico 5: Relação entre o pK_a dos grupos azotados e ΔT_m (°C) do composto obtida para cada um dos tipos de cadeia lateral (*KRas21*).

ANEXO XVI: TABELAS DE PERCENTAGENS DE π - π *STACKING*, INTERACÇÕES IÃO-ANEL AROMÁTICO, LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO E TOTAL DE CONFÓRMEROS DO LIGANDO COM INTERACÇÃO COM O RECEPTOR

Tabela 30: Percentagens de interacção π - π *stacking* para a estrutura 1KF1.

Lig.	1KF1																					
	L-L	L-AHB							AHB-L							AHB-AHB						
	---	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	39%	47%	48%	45%	56%	48%	46%	45%	49%	48%	44%	44%	49%	42%	44%	49%	49%	42%	50%	47%	42%	46%
2	56%	52%	49%	51%	68%	45%	49%	47%	53%	52%	54%	53%	50%	56%	54%	55%	50%	57%	66%	50%	56%	53%
3	43%	39%	41%	44%	59%	41%	43%	42%	50%	47%	51%	50%	41%	39%	46%	47%	44%	52%	49%	46%	55%	49%
4	53%	58%	57%	57%	63%	49%	56%	45%	54%	54%	59%	52%	58%	58%	59%	54%	56%	54%	70%	55%	60%	57%
5	49%	45%	51%	48%	49%	47%	50%	50%	51%	49%	52%	55%	47%	53%	55%	52%	47%	52%	53%	47%	50%	54%
5p	41%	43%	43%	43%	53%	42%	42%	41%	47%	51%	42%	51%	46%	62%	46%	47%	52%	47%	39%	52%	48%	48%
6	66%	60%	59%	66%	66%	63%	61%	61%	57%	56%	58%	56%	58%	58%	56%	59%	56%	58%	57%	55%	60%	58%
6p	64%	61%	64%	63%	59%	63%	63%	64%	62%	61%	56%	64%	60%	61%	61%	62%	62%	58%	56%	62%	58%	59%
7	35%	38%	40%	42%	60%	39%	38%	38%	39%	45%	42%	42%	46%	41%	41%	40%	41%	45%	38%	45%	46%	41%
8	46%	45%	47%	49%	12%	48%	46%	46%	48%	47%	50%	47%	46%	50%	51%	50%	44%	49%	42%	47%	44%	50%
9	49%	54%	56%	54%	50%	58%	54%	55%	53%	50%	58%	51%	48%	56%	54%	55%	53%	57%	54%	48%	56%	57%
9p	45%	43%	43%	39%	51%	44%	43%	44%	34%	35%	40%	35%	36%	35%	36%	35%	34%	38%	33%	32%	36%	35%

Tabela 31: Percentagens de interacção π - π *stacking* para a estrutura 2JPZ.

Lig.	2JPZ																					
	L-L	L-AHB							AHB-L							AHB-AHB						
	---	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	28%	30%	30%	30%	33%	29%	30%	31%	35%	29%	37%	36%	30%	36%	32%	36%	29%	33%	36%	26%	38%	36%
2	44%	47%	46%	45%	46%	45%	43%	46%	51%	44%	55%	52%	46%	65%	50%	51%	45%	52%	51%	50%	54%	50%
3	42%	39%	36%	37%	35%	37%	38%	37%	47%	41%	47%	49%	43%	51%	46%	45%	41%	50%	46%	42%	46%	47%
4	56%	43%	39%	37%	50%	41%	53%	43%	49%	44%	55%	49%	43%	53%	51%	50%	36%	55%	48%	43%	56%	50%
5	39%	40%	41%	41%	41%	41%	43%	40%	47%	38%	51%	48%	35%	52%	48%	50%	40%	53%	46%	40%	52%	49%
5p	29%	39%	42%	43%	42%	45%	40%	42%	39%	25%	48%	36%	25%	48%	38%	36%	41%	41%	41%	27%	51%	38%
6	39%	41%	40%	39%	37%	37%	38%	41%	49%	43%	56%	46%	43%	52%	48%	48%	47%	52%	48%	44%	52%	48%
6p	47%	40%	40%	38%	39%	40%	40%	39%	49%	40%	57%	53%	42%	58%	53%	50%	41%	58%	53%	43%	58%	52%
7	40%	28%	25%	30%	27%	29%	33%	30%	26%	24%	28%	26%	21%	23%	28%	26%	21%	28%	24%	23%	27%	23%
8	33%	24%	38%	30%	31%	33%	31%	30%	32%	33%	29%	28%	30%	31%	31%	23%	26%	24%	24%	26%	23%	26%
9	25%	31%	34%	33%	24%	25%	29%	36%	27%	28%	32%	30%	25%	35%	29%	31%	28%	32%	29%	32%	35%	27%
9p	32%	20%	30%	28%	29%	26%	19%	27%	29%	27%	31%	31%	22%	38%	30%	30%	26%	33%	31%	26%	38%	30%

Tabela 32: Percentagens de interacção π - π *stacking* para a estrutura 143D.

	143D			
	L-L	L-AHB	AHB-L	AHB-AHB
Lig.	---	10-4	10-4	10-4
1	0%	1%	3%	0%
2	0%	2%	2%	0%
3	0%	1%	2%	0%
4	0%	5%	4%	0%
5	0%	2%	2%	3%
5p	5%	4%	4%	0%
6	4%	6%	2%	2%
6p	0%	0%	0%	0%
7	1%	3%	0%	0%
8	3%	3%	2%	0%
9	0%	0%	3%	2%
9p	0%	4%	3%	0%

Tabela 33: Percentagens de interacção π -catião para a estrutura 143D.

	143D			
	L-L	L-AHB	AHB-L	AHB-AHB
Lig.	---	10-4	10-4	10-4
1	0%	0%	0%	0%
2	0%	1%	0%	0%
3	0%	1%	0%	0%
4	0%	1%	3%	0%
5	0%	1%	0%	0%
5p	1%	1%	1%	0%
6	0%	0%	1%	1%
6p	1%	1%	0%	0%
7	0%	0%	4%	0%
8	1%	2%	2%	0%
9	1%	1%	1%	0%
9p	0%	0%	1%	0%

Tabela 34: Percentagens de interacção π -catião para a estrutura 1KF1.

Lig.	1KF1																					
	L-L	L-AHB							AHB-L							AHB-AHB						
	---	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	17%	15%	16%	17%	25%	15%	17%	14%	28%	26%	30%	28%	29%	28%	28%	27%	28%	29%	12%	27%	27%	30%
2	9%	19%	15%	14%	19%	16%	16%	13%	22%	26%	29%	19%	23%	28%	16%	23%	22%	26%	25%	25%	27%	28%
3	21%	39%	22%	19%	26%	18%	20%	19%	27%	21%	28%	31%	19%	22%	24%	28%	24%	25%	27%	22%	27%	27%
4	13%	58%	20%	16%	20%	22%	22%	18%	15%	15%	19%	23%	18%	18%	22%	19%	18%	16%	20%	15%	15%	14%
5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
5p	15%	16%	17%	16%	26%	14%	15%	15%	21%	26%	23%	20%	30%	19%	23%	25%	22%	21%	20%	28%	25%	23%
6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
6p	14%	12%	13%	15%	31%	12%	15%	15%	19%	19%	17%	22%	21%	20%	22%	18%	25%	22%	38%	21%	18%	22%
7	16%	16%	16%	15%	17%	12%	15%	17%	23%	19%	25%	27%	28%	22%	23%	28%	19%	22%	15%	26%	25%	25%
8	18%	19%	19%	20%	7%	17%	20%	19%	29%	27%	32%	31%	26%	31%	27%	27%	25%	33%	23%	31%	32%	30%
9	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
9p	23%	24%	23%	22%	26%	23%	22%	23%	15%	22%	16%	13%	21%	14%	16%	11%	23%	19%	39%	20%	14%	12%

Tabela 35: Percentagens de interacção π -catião para a estrutura 2JPZ.

2JPZ																						
Lig.	L-L	L-AHB							AHB-L							AHB-AHB						
	---	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	28%	30%	29%	31%	31%	28%	29%	28%	31%	30%	38%	34%	36%	37%	35%	31%	34%	35%	33%	34%	37%	32%
2	40%	35%	38%	37%	38%	38%	37%	34%	33%	33%	35%	37%	32%	28%	35%	33%	32%	37%	33%	31%	34%	34%
3	29%	30%	30%	30%	30%	33%	29%	32%	38%	39%	41%	36%	35%	38%	38%	24%	37%	33%	38%	37%	39%	38%
4	30%	33%	25%	31%	25%	37%	26%	30%	30%	42%	34%	30%	42%	32%	34%	36%	25%	32%	33%	40%	31%	33%
5	25%	26%	23%	27%	26%	23%	18%	26%	27%	25%	29%	28%	24%	29%	27%	27%	25%	26%	27%	27%	25%	29%
5p	28%	32%	32%	32%	35%	30%	17%	32%	28%	22%	26%	28%	28%	23%	27%	31%	29%	35%	27%	27%	24%	28%
6	18%	17%	18%	18%	20%	20%	17%	17%	14%	18%	26%	14%	16%	17%	18%	16%	18%	19%	17%	32%	19%	16%
6p	24%	28%	30%	28%	29%	33%	31%	28%	39%	35%	31%	32%	39%	27%	36%	37%	37%	30%	31%	39%	27%	37%
7	27%	27%	37%	33%	33%	30%	29%	32%	36%	33%	34%	35%	35%	39%	31%	38%	37%	38%	32%	37%	36%	32%
8	27%	22%	25%	19%	28%	28%	19%	24%	38%	36%	27%	28%	31%	40%	34%	29%	26%	27%	27%	27%	29%	25%
9	22%	19%	13%	16%	18%	18%	19%	20%	21%	20%	21%	21%	20%	22%	17%	21%	22%	22%	21%	23%	22%	21%
9p	32%	35%	35%	37%	34%	35%	26%	33%	31%	31%	31%	30%	26%	32%	31%	29%	28%	35%	29%	27%	32%	29%

Tabela 36: Percentagens de interacção π -catião para a estrutura 1KF1.

Lig.	1KF1																					
	L-L	L-AHB							AHB-L							AHB-AHB						
	---	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	27%	33%	35%	32%	40%	32%	38%	33%	30%	30%	29%	29%	29%	27%	28%	32%	31%	29%	12%	32%	26%	29%
2	28%	30%	37%	34%	43%	32%	36%	33%	23%	31%	24%	24%	27%	21%	23%	23%	27%	25%	25%	25%	24%	21%
3	41%	39%	39%	39%	44%	36%	34%	37%	26%	28%	26%	27%	33%	27%	28%	28%	27%	30%	27%	26%	27%	29%
4	46%	47%	53%	43%	55%	38%	36%	50%	33%	32%	30%	40%	32%	31%	35%	32%	31%	35%	20%	35%	34%	32%
5	9%	10%	11%	11%	11%	11%	12%	7%	6%	6%	6%	6%	11%	6%	6%	6%	7%	6%	5%	7%	5%	6%
5p	46%	45%	43%	48%	58%	42%	41%	43%	31%	27%	27%	35%	31%	35%	30%	29%	31%	28%	22%	27%	28%	28%
6	7%	5%	4%	6%	8%	6%	7%	5%	6%	8%	9%	12%	8%	7%	9%	9%	8%	6%	14%	6%	9%	9%
6p	35%	39%	35%	36%	57%	33%	35%	35%	34%	36%	31%	36%	39%	29%	31%	34%	35%	26%	38%	37%	28%	36%
7	39%	43%	40%	40%	54%	40%	39%	42%	33%	29%	28%	30%	28%	32%	32%	34%	35%	31%	28%	34%	31%	35%
8	28%	30%	27%	30%	65%	31%	30%	26%	16%	18%	24%	16%	21%	23%	17%	17%	16%	21%	25%	21%	22%	15%
9	9%	11%	10%	12%	9%	9%	11%	11%	9%	8%	11%	10%	8%	8%	8%	8%	7%	10%	9%	9%	8%	10%
9p	43%	41%	45%	48%	62%	41%	46%	43%	39%	35%	36%	37%	39%	37%	41%	41%	36%	43%	39%	42%	37%	41%

Tabela 37: Percentagens de interação π -catião para a estrutura 2JPZ.

2JPZ																						
Mol.	L-L	L-AHB							AHB-L							AHB-AHB						
	---	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	30%	28%	28%	31%	29%	28%	31%	29%	23%	30%	24%	25%	27%	25%	25%	25%	28%	24%	23%	28%	24%	27%
2	39%	44%	35%	35%	32%	36%	33%	38%	33%	31%	27%	31%	34%	16%	32%	32%	32%	28%	30%	33%	30%	33%
3	43%	47%	48%	50%	49%	50%	51%	48%	36%	44%	36%	38%	45%	38%	36%	33%	44%	32%	35%	38%	35%	36%
4	45%	48%	44%	41%	44%	44%	43%	44%	36%	30%	27%	26%	29%	29%	29%	32%	36%	28%	29%	30%	28%	30%
5	46%	48%	45%	44%	46%	46%	40%	46%	37%	41%	39%	40%	37%	37%	38%	39%	36%	40%	39%	42%	37%	38%
5p	59%	51%	54%	50%	68%	54%	47%	52%	46%	45%	47%	49%	49%	51%	47%	49%	51%	46%	47%	40%	52%	45%
6	37%	40%	36%	47%	34%	36%	39%	38%	31%	37%	30%	32%	34%	26%	30%	31%	36%	32%	30%	32%	28%	28%
6p	61%	60%	59%	69%	60%	61%	60%	59%	49%	52%	46%	52%	53%	50%	49%	53%	53%	51%	48%	52%	48%	55%
7	45%	43%	48%	46%	47%	46%	53%	42%	35%	35%	35%	36%	32%	40%	33%	36%	34%	35%	33%	36%	38%	37%
8	27%	33%	39%	42%	30%	33%	31%	30%	28%	32%	20%	21%	32%	26%	25%	19%	21%	20%	24%	25%	20%	23%
9	53%	62%	48%	51%	50%	52%	57%	45%	43%	45%	38%	40%	43%	42%	38%	37%	44%	45%	42%	45%	42%	38%
9p	69%	65%	72%	70%	67%	57%	60%	68%	53%	54%	59%	54%	57%	53%	53%	52%	53%	54%	55%	54%	56%	54%

Tabela 38: Percentagens de interacção π -catião para a estrutura 143D.

Mol.	143D			
	L-L	L-AHB	AHB-L	AHB-AHB
	---	10-4	10-4	10-4
1	54%	44%	46%	51%
2	59%	45%	44%	61%
3	60%	64%	55%	55%
4	65%	56%	47%	58%
5	63%	61%	64%	55%
5p	65%	60%	55%	60%
6	60%	73%	65%	63%
6p	67%	70%	59%	67%
7	65%	71%	59%	61%
8	55%	55%	46%	60%
9	68%	64%	63%	65%
9p	77%	64%	66%	60%

ANEXO XVII: TABELAS DE ΔG PARA OS COMPOSTOS **1-4** E **6-8**, OBTIDAS POR *DOCKING* MOLECULAR

Tabela 39: Valores obtidos de ΔG para o método Alpha-HB/Alpha HB.

Ligando	ΔG (kcal/mol)													
	1KF1							2JPZ						
	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	-34,29	-32,33	-66,67	-57,85	-64,74	-129,58	-129,67	-41,77	-37,26	-86,37	-83,45	-74,32	-172,75	-167,03
2	-29,36	-29,11	-58,65	-51,87	-53,10	-126,18	-117,31	-41,45	-34,39	-86,28	-79,95	-74,95	-188,61	-184,61
3	-35,66	-26,79	-77,33	-65,36	-53,60	-150,30	-142,66	-45,39	-42,40	-85,44	-85,13	-84,91	-166,75	-157,62
4	-38,00	-35,39	-74,08	-65,96	-70,70	-147,96	-153,90	-46,29	-48,35	-94,51	-86,87	-89,06	-189,12	-182,63
6	-34,60	-36,29	-67,00	-84,48	-72,64	-154,26	-138,55	-46,20	-46,22	-92,42	-92,49	-97,74	-184,74	-184,80
7	-34,87	-32,57	-75,55	-70,75	-64,81	-151,19	-146,07	-49,95	-43,96	-88,30	-91,83	-86,40	-187,85	-172,31
8	-35,81	-34,97	-85,51	-75,35	-69,92	-170,80	-150,95	-43,84	-36,35	-92,08	-87,70	-79,35	-179,43	-176,44

Tabela 40: Valores de ΔG obtidos para o método Alpha-HB/London dG.

Ligando	ΔG (kcal/mol)													
	1KF1							2JPZ						
	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	-10,56	-10,21	-10,56	-10,56	-10,21	-10,57	-10,56	-9,51	-10,03	-9,78	-9,62	-11,09	-9,79	-9,80
2	-11,69	-11,43	-10,98	-11,69	-11,69	-11,10	-11,68	-10,68	-10,69	-10,49	-10,68	-10,72	-10,76	-10,48
3	-11,37	-11,38	-11,05	-11,37	-11,46	-11,08	-10,26	-10,60	-10,60	-11,34	-10,61	-10,60	-11,96	-10,59
4	-11,22	-11,22	-11,30	-11,57	-11,22	-11,22	-11,56	-12,27	-11,00	-10,67	-11,66	-11,39	-10,70	-11,66
6	-8,99	-8,72	-9,58	-8,42	-8,72	-9,73	-9,00	-9,68	-10,20	-10,84	-10,54	-10,15	-10,50	-10,54
7	-11,23	-11,94	-12,38	-10,70	-10,70	-12,38	-10,70	-10,71	-10,43	-10,59	-11,69	-10,27	-10,71	-10,42
8	-13,11	-12,88	-13,32	-13,22	-12,89	-13,04	-13,05	-11,78	-13,43	-12,45	-10,40	-11,75	-12,35	-11,33

Tabela 41: Valores de ΔG obtidos para o método London dG/Alpha-HB.

Ligando	ΔG (kcal/mol)													
	1KF1							2JPZ						
	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8	5-2	5-4	10-2	10-4	10-8	20-4	20-8
1	-32,39	-32,39	-68,14	14,91	-64,69	-136,23	-129,37	-41,16	-37,23	-89,21	-82,05	-74,06	-172,38	-165,48
2	-26,81	-24,83	-58,79	-7,80	-49,62	-117,47	-107,45	-41,72	-37,24	-85,73	-84,13	-74,48	-171,46	-166,46
3	-35,67	-31,59	-77,27	-65,34	-63,19	-154,50	-138,32	-43,99	-41,89	-83,15	-78,76	-78,78	-166,13	-157,59
4	-38,59	-27,22	-72,21	21,11	-70,22	-141,23	-140,45	-40,12	-42,82	-81,48	-92,56	-92,70	-189,10	-177,79
6	-33,02	-36,16	-65,86	-84,62	-72,48	-131,69	-131,90	-44,90	-42,52	-95,75	-89,85	-85,39	-191,44	-179,62
7	-37,12	-32,49	-76,14	-90,54	-68,97	-152,08	-146,15	-52,16	-54,14	-102,27	-104,35	-108,28	-172,49	-208,55
8	-37,70	-29,19	-85,37	-82,59	-58,45	-171,08	-139,11	-43,62	-43,46	-102,12	-86,34	-78,29	-170,89	-168,52

Tabela 42: Valores de ΔG obtidos para o método London dG/Alpha-HB.

Ligando	ΔG (kcal/mol)	
	1KF1	2JPZ
1	-11,61	-11,01
2	-11,49	-10,84
3	-12,54	-10,05
4	-11,57	-12,70
6	-8,56	-9,94
7	-10,69	-11,84
8	-13,80	-11,41

Tabela 43: Valores de ΔG obtidos para o método Alpha-HB (2-4)/London dG.

Ligando	ΔG (kcal/mol)	
	1KF1	2JPZ
1	-9,43	-10,03
2	-9,70	-9,14
3	-10,58	-10,12
4	-9,81	-9,30
6	-8,44	-7,87
7	-10,44	-10,78
8	-10,84	-9,66

ANEXO XVIII: GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE ΔT_m E RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR

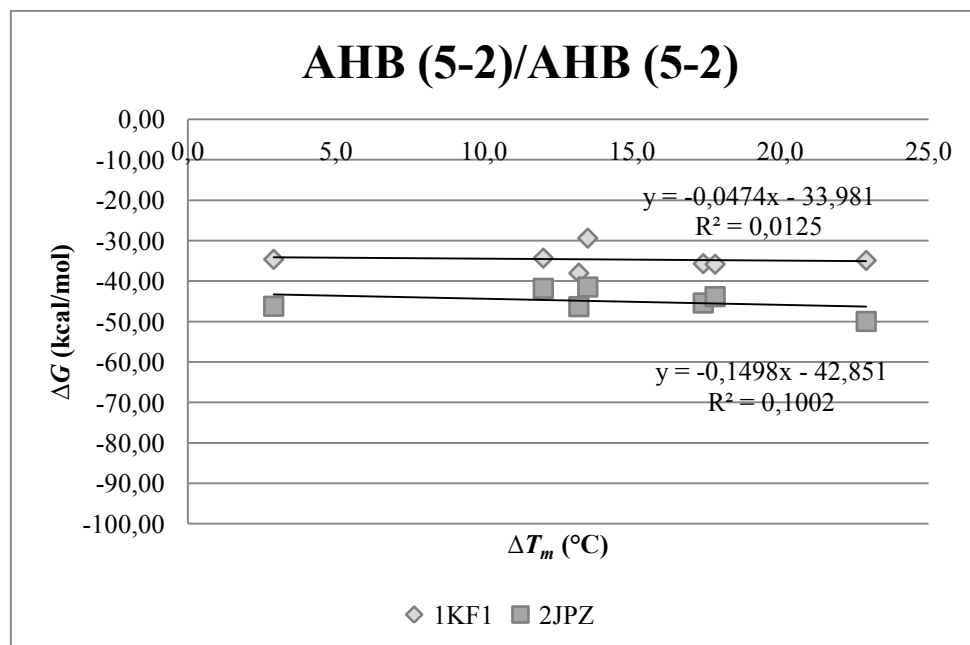


Gráfico 6: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (5-2)/Alpha HB (5-2).

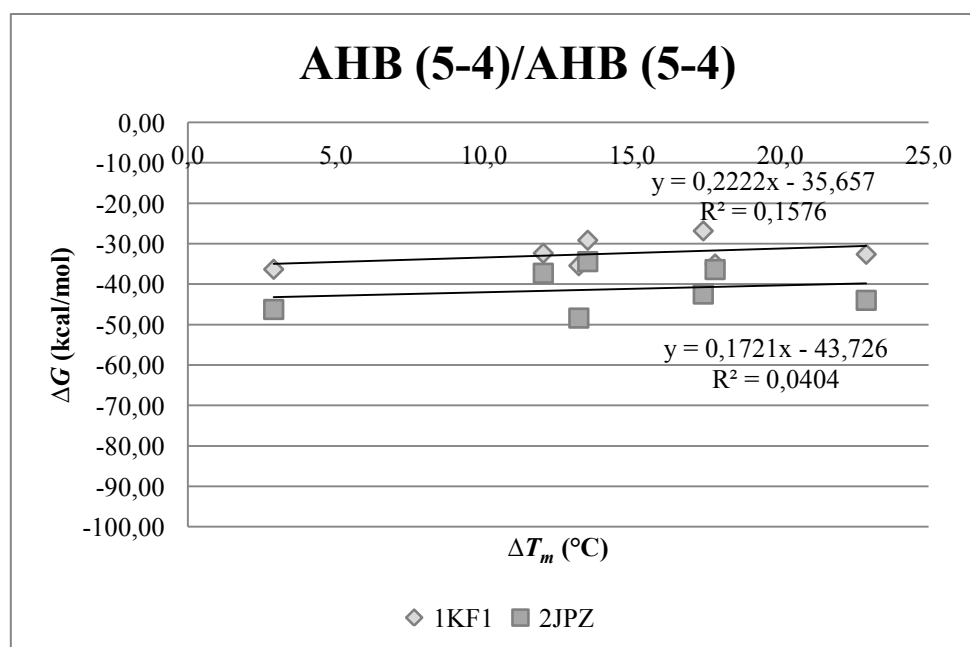


Gráfico 7: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (5-4)/Alpha HB (5-4).

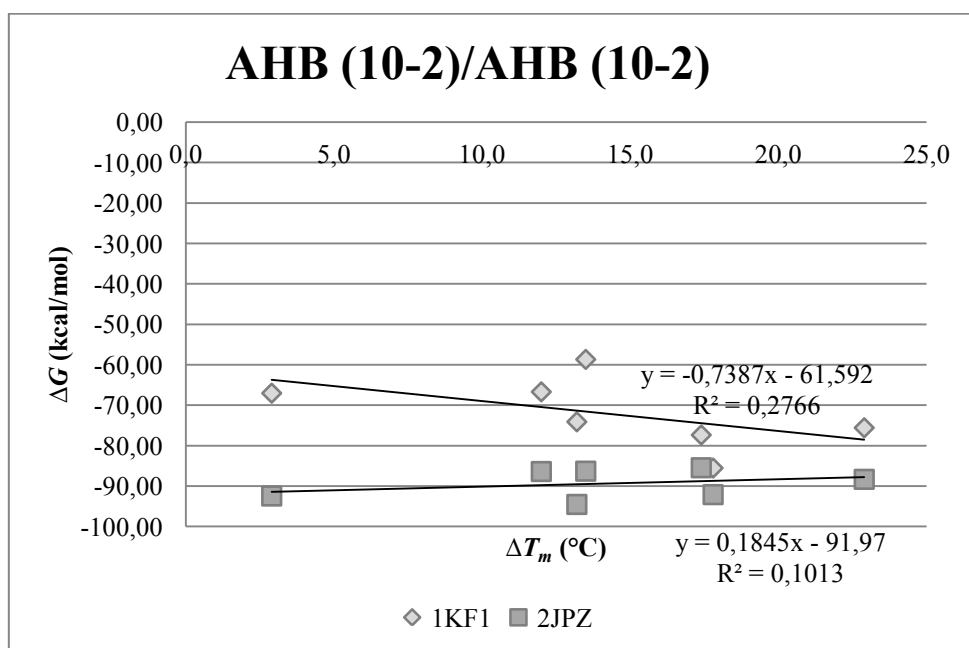


Gráfico 8: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (10-2)/Alpha HB (10-2).

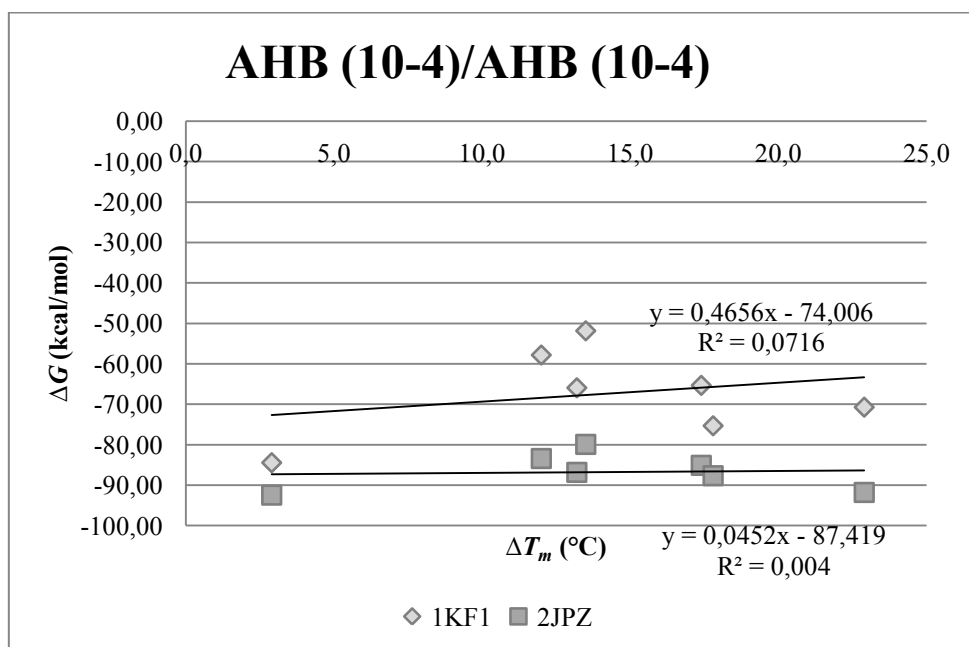


Gráfico 9: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (10-4)/Alpha HB (10-4).

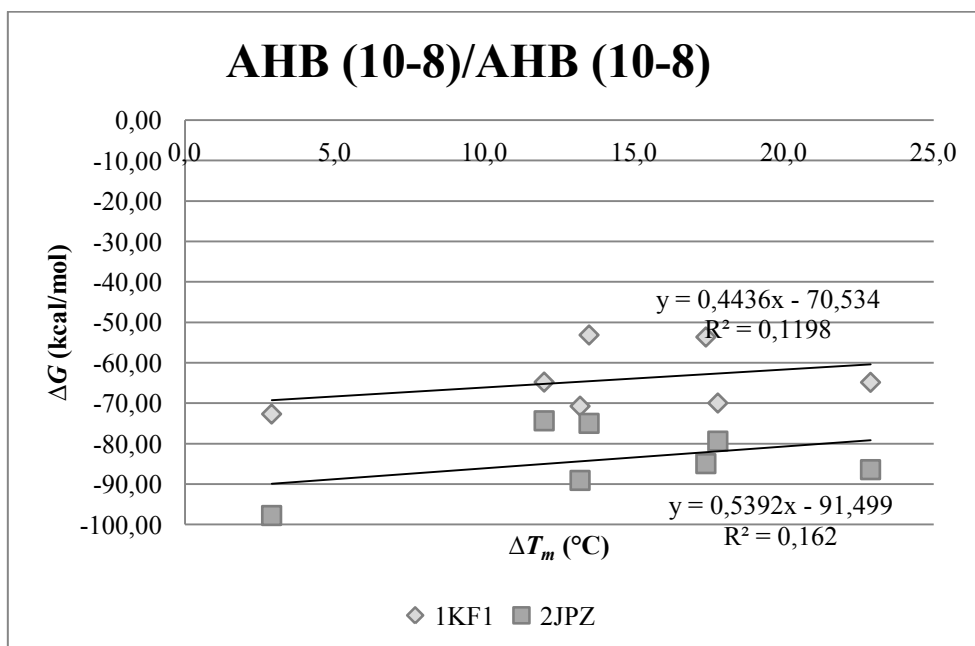


Gráfico 10: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (10-8)/Alpha HB (10-8).

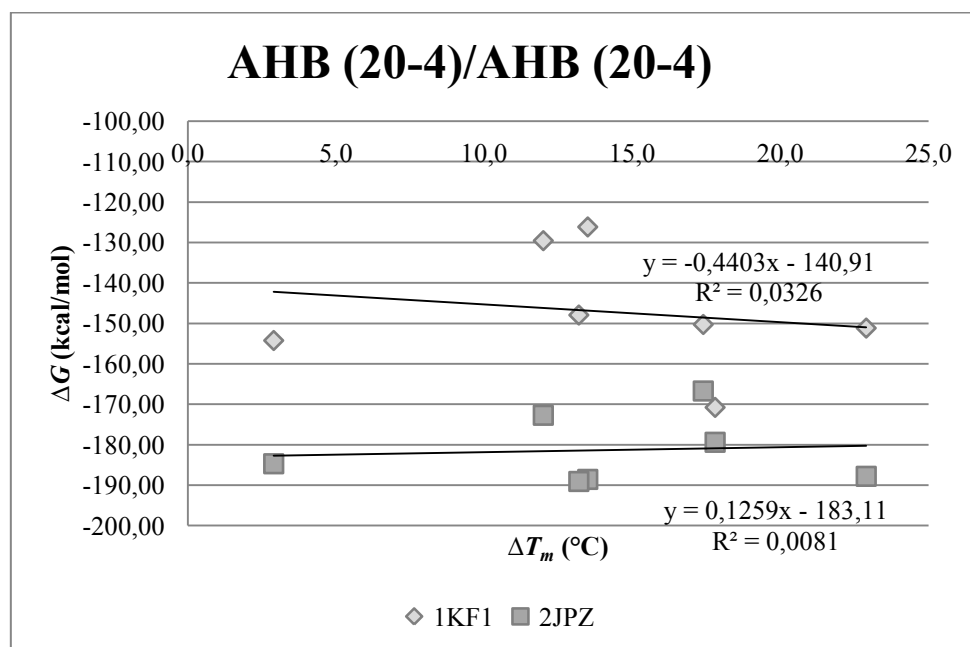


Gráfico 11: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (20-4)/Alpha HB (20-4).

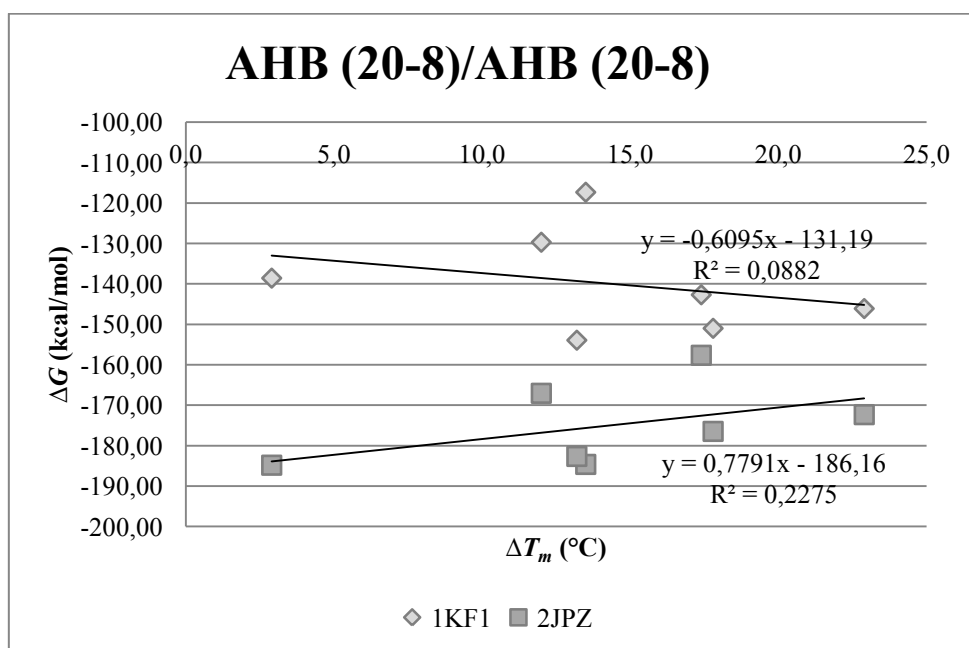


Gráfico 12: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (20-8)/Alpha HB (20-8).

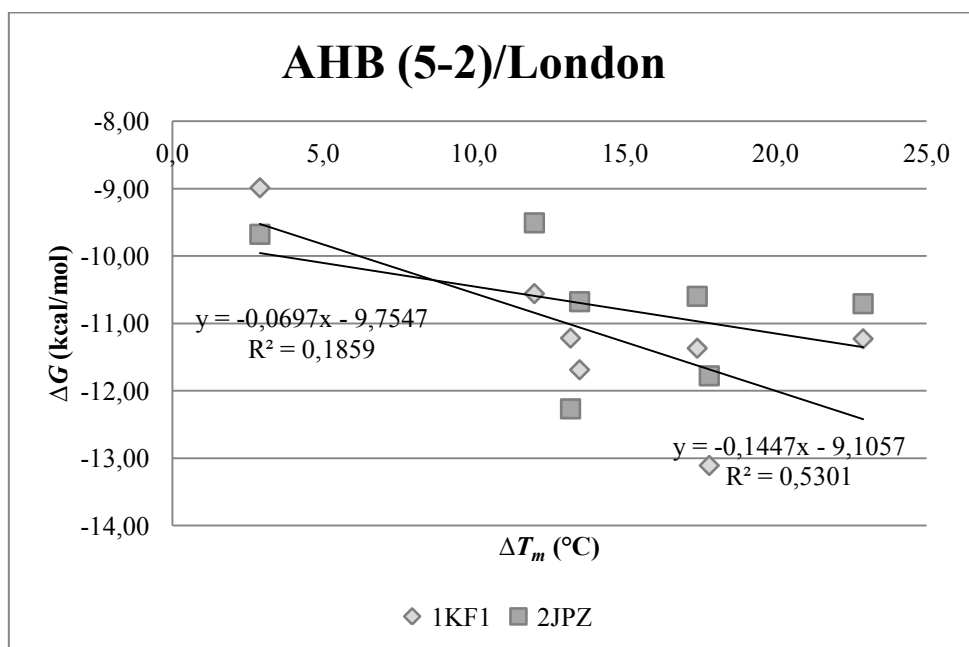


Gráfico 13: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (5-2)/London dG.

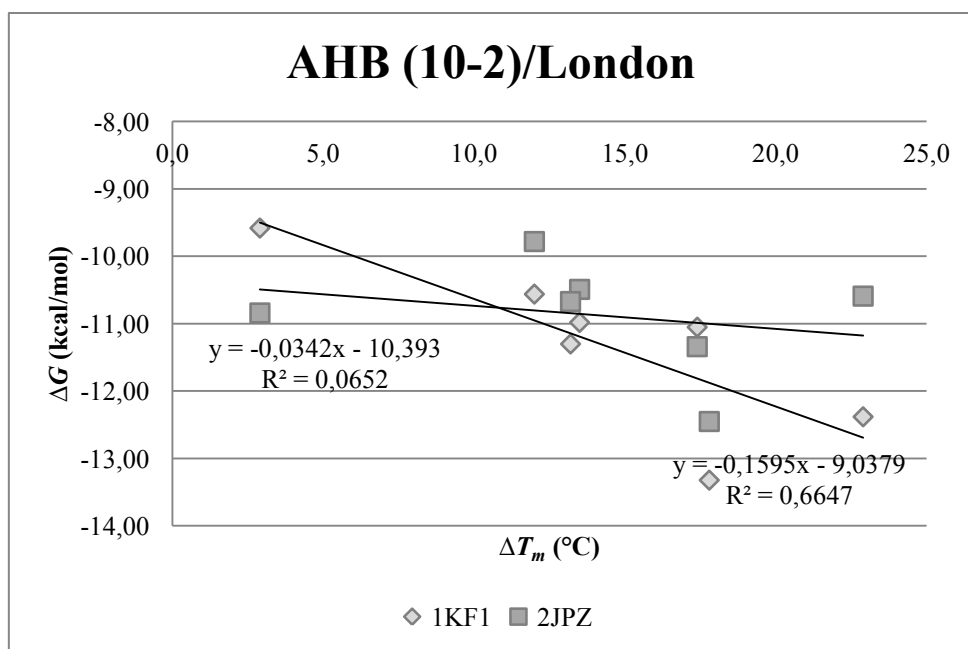


Gráfico 14: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (10-2)/London dG.

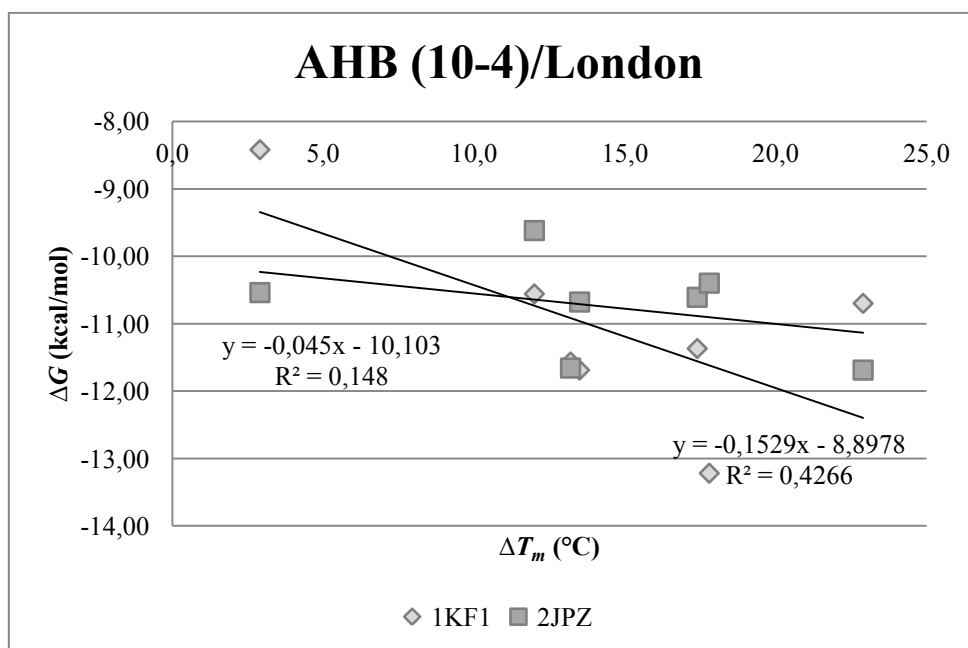


Gráfico 15: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (10-4)/London dG.

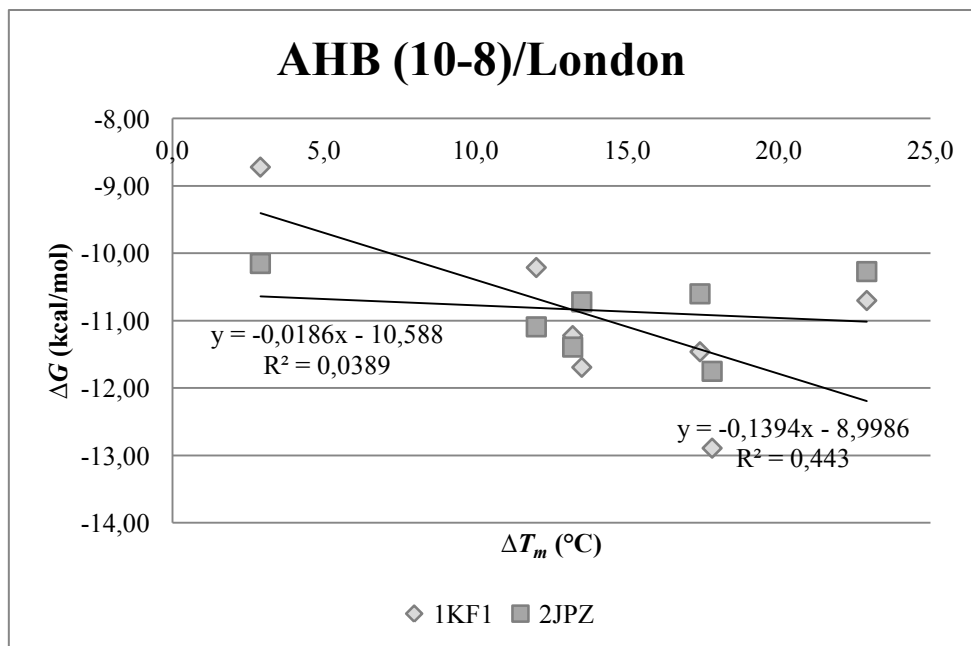


Gráfico 16: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (10-8)/London dG.

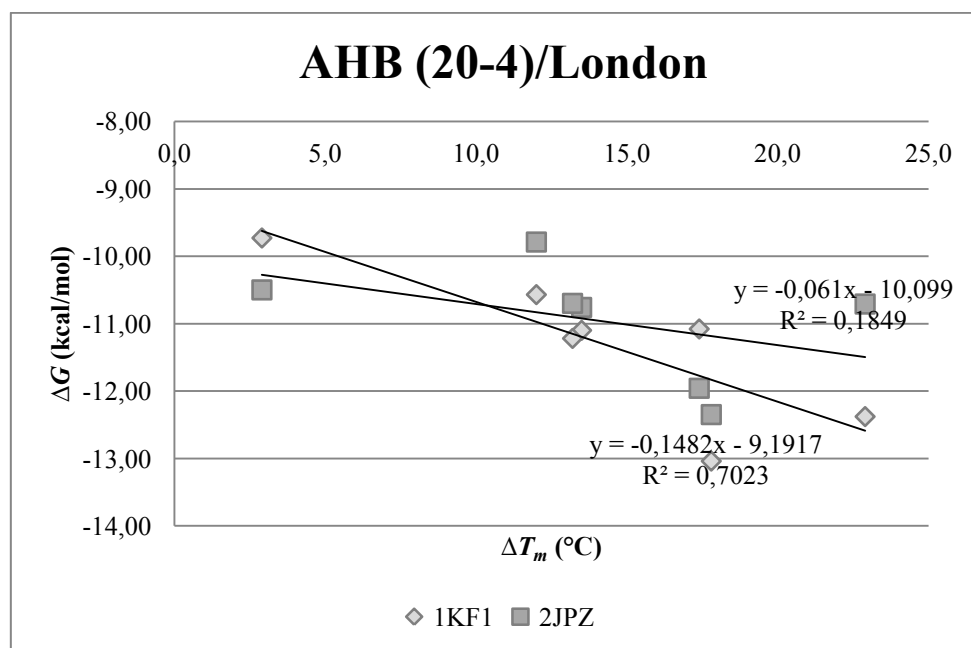


Gráfico 17: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (20-4)/London dG.

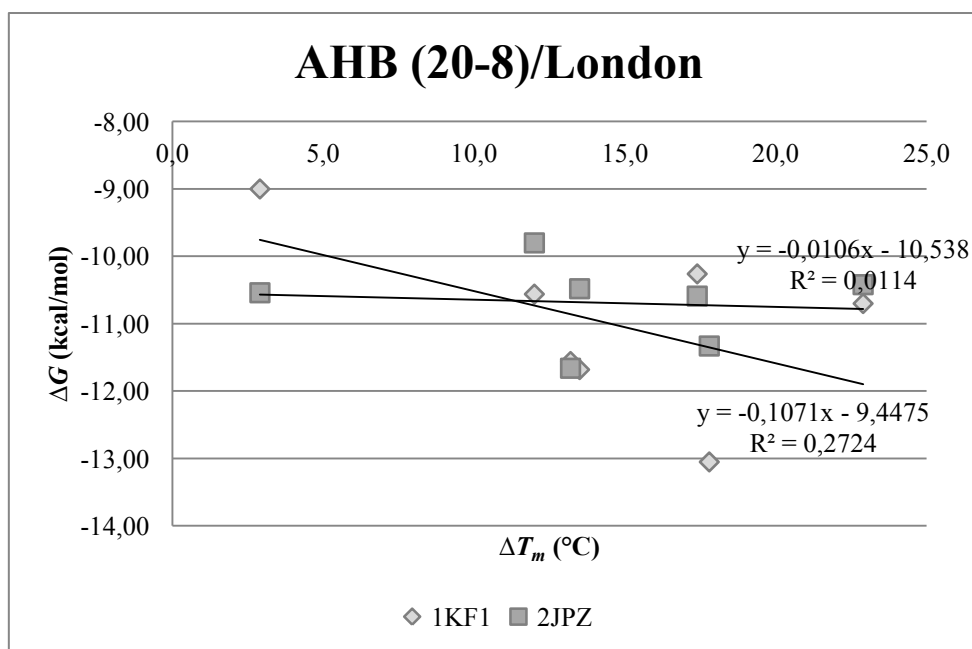


Gráfico 18: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método Alpha HB (20-8)/London dG.

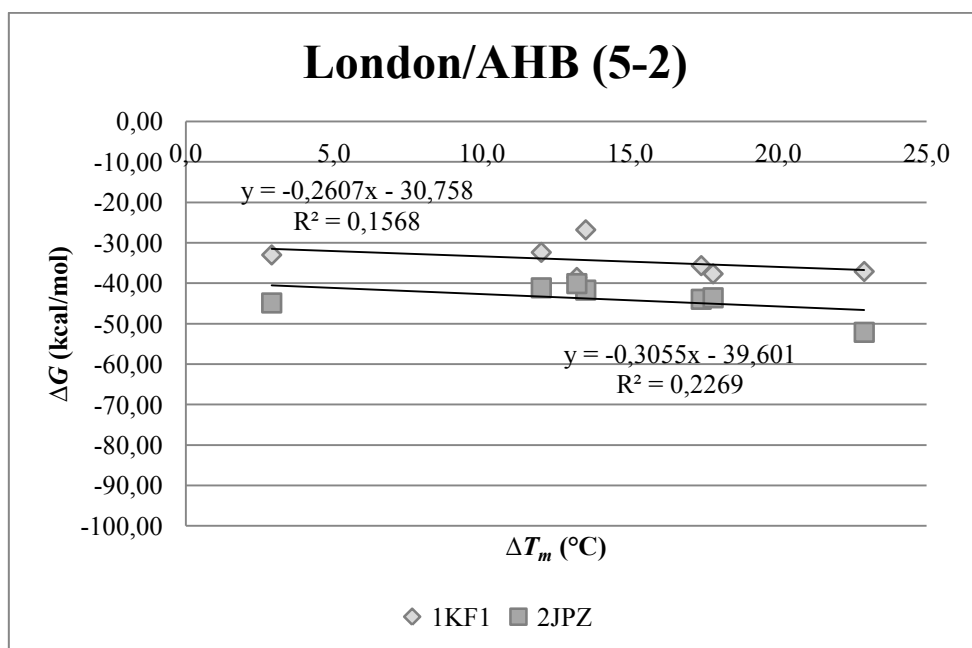


Gráfico 19: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (5-2).

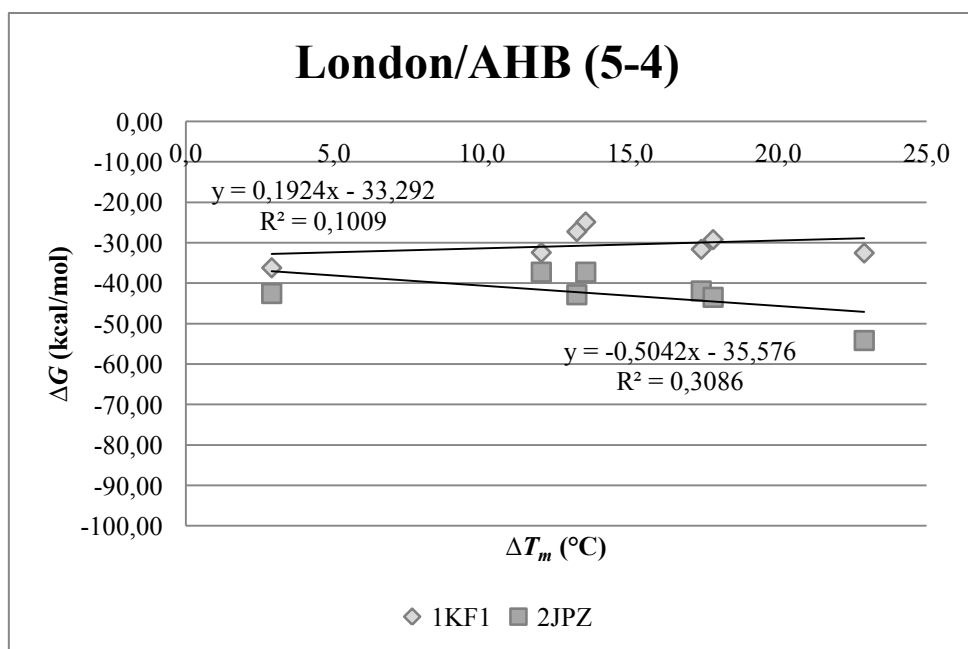


Gráfico 20: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (5-4).

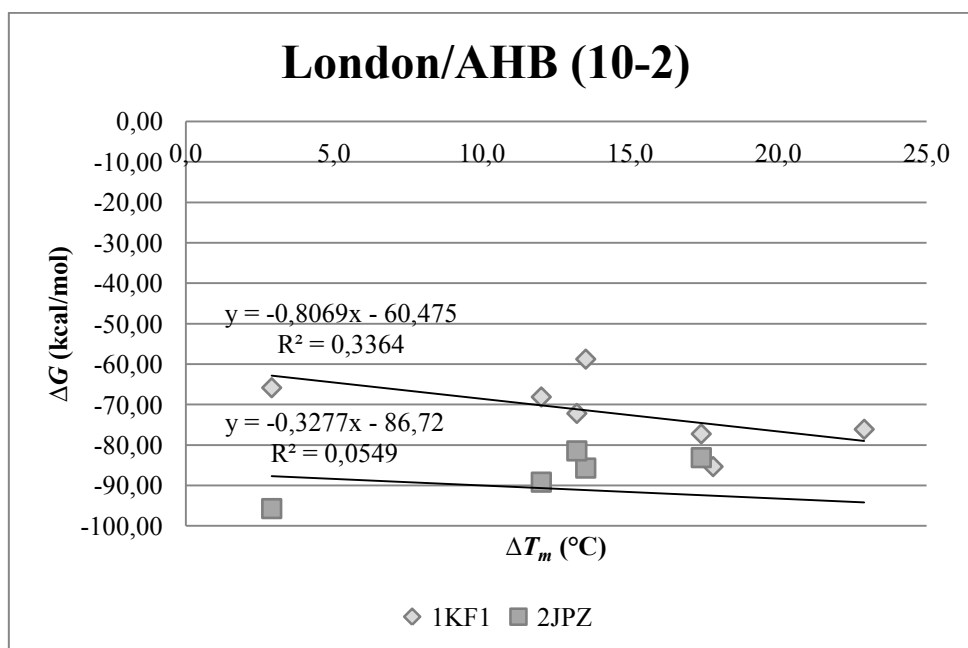


Gráfico 21: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (10-2).

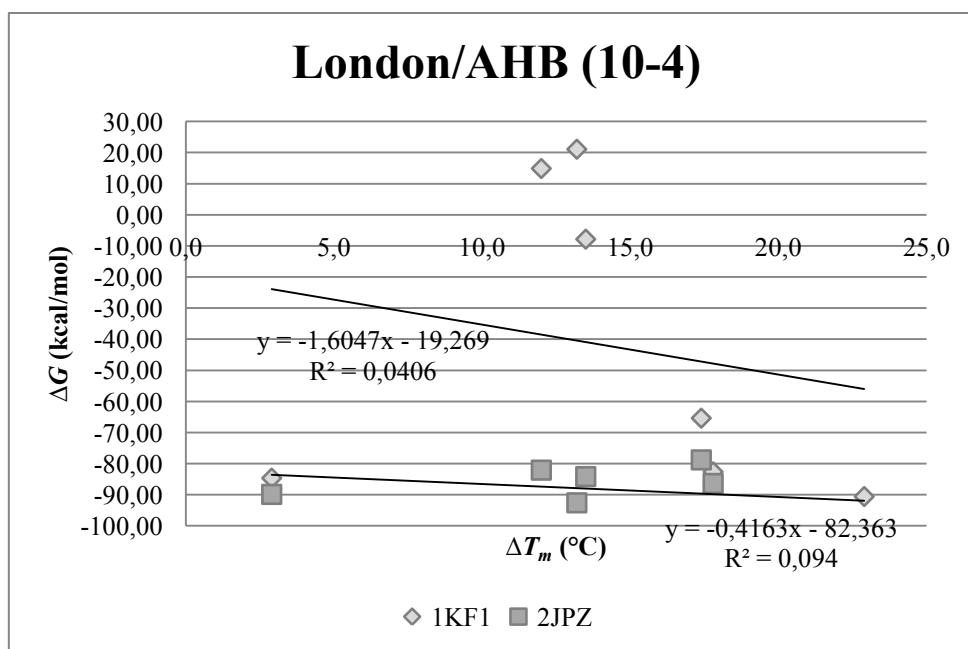


Gráfico 22: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (10-4).

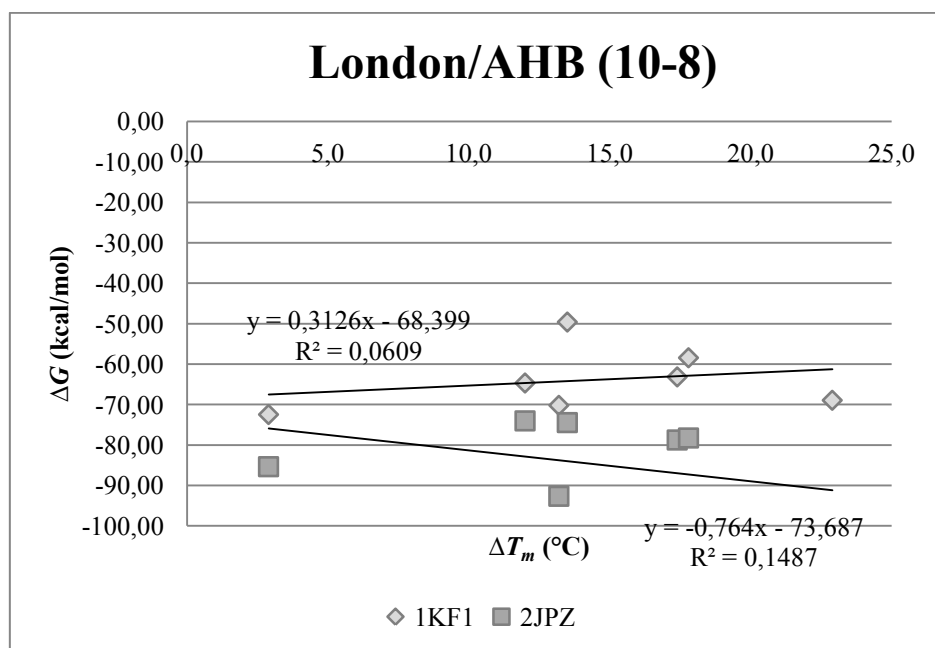


Gráfico 23: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (10-8).

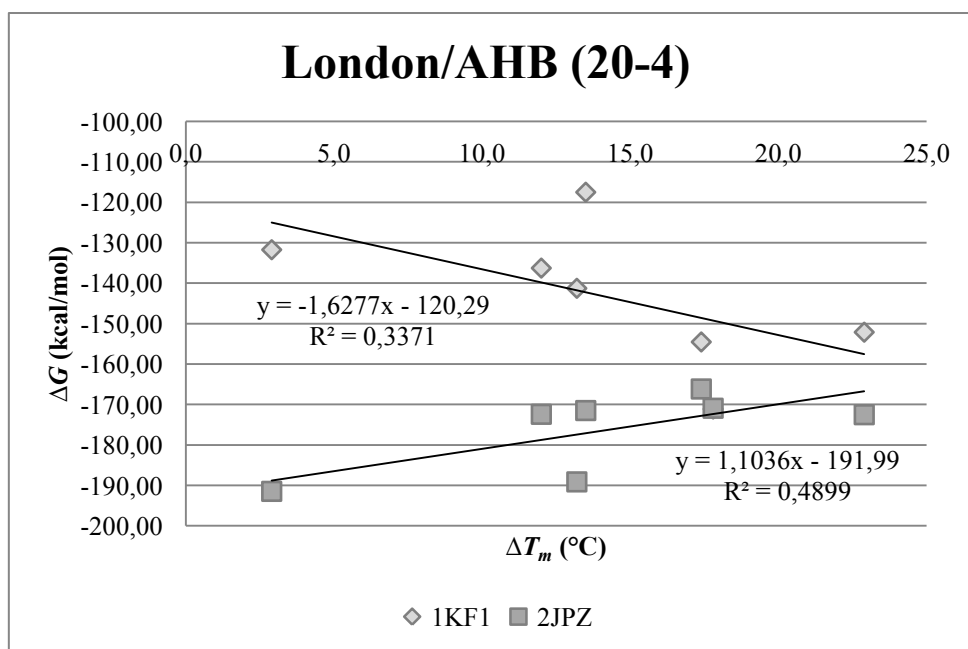


Gráfico 24: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (20-4).

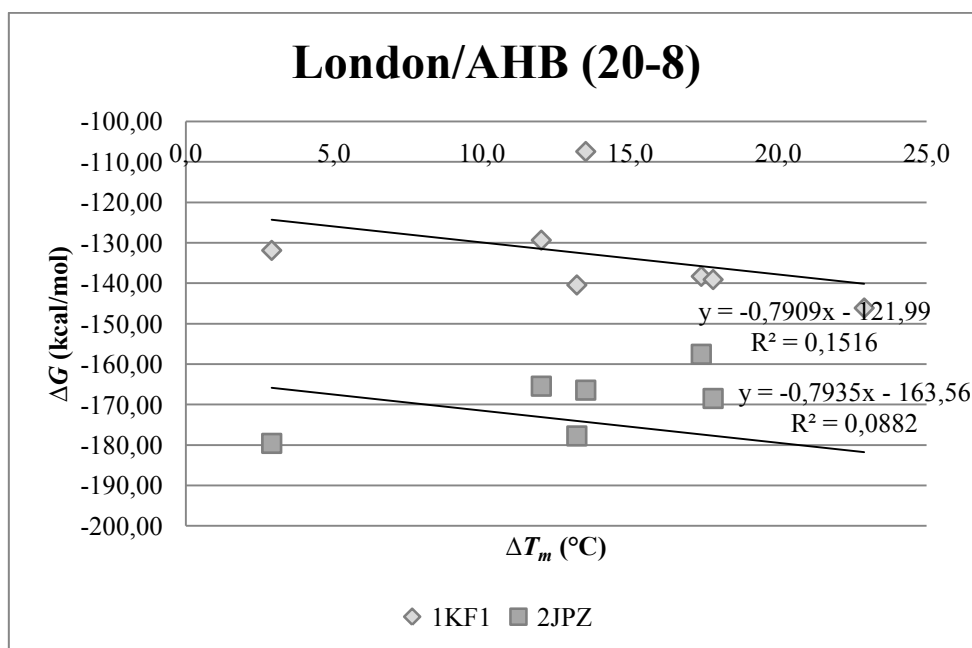


Gráfico 25: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/Alpha HB (20-8).

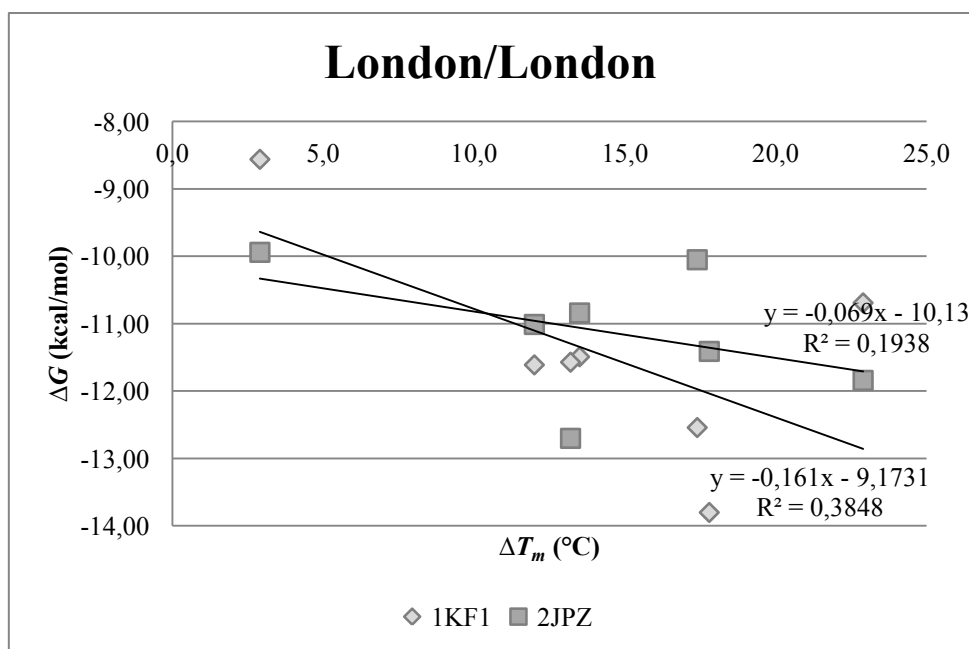


Gráfico 26: ΔG (kcal/mol) obtido em função do ΔT_m (°C) para o método London dG/London dG.